

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 460**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2005 E 05807469 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1786837**

54 Título: **Anticuerpos para Dkk-1**

30 Prioridad:

04.08.2004 US 598791 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2013

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CALIFORNIA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**LI, JI;
SHEN, WENYAN;
LU, HSIENG SEN y
RICHARDS, WILLIAM GLEASON**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 414 460 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

Anticuerpos para Dkk-1.

Campo de la invención

La invención se refiere a agentes de unión selectiva para la proteína dickkopf-1 (Dkk-1), y más concretamente, a anticuerpos y dominios de unión a antígeno y regiones CDR que median la unión selectiva a un epítipo localizado en la mitad carboxilada de la proteína Dkk-1.

Antecedentes de la invención

El tejido óseo vivo muestra un equilibrio dinámico entre el depósito y la resorción de hueso. Estos procesos están mediados principalmente por dos tipos de células: osteoblastos, que secretan moléculas que comprenden la matriz orgánica del hueso, y osteoclastos, que median la disolución de la matriz ósea y la solubilización de las sales del hueso. En individuos jóvenes con hueso en crecimiento, la tasa de depósito óseo excede la tasa de resorción ósea, mientras en individuos de edad más avanzada la tasa de resorción puede exceder el depósito conduciendo a una pérdida neta de masa ósea. Esta última situación puede conducir a un incremento del riesgo de fractura ósea y a una reparación lenta o incompleta de los huesos rotos. La comprensión del mecanismo molecular que subyace a estos procesos es crítica para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades óseas. La genética humana ha jugado un papel principal en la elucidación de estos mecanismos y ha permitido la identificación de múltiples factores implicados en la actividad tanto catabólica como anabólica del hueso (Janssens and Van Hul, *Hum Mol Gen*, 11(20):2385-93, 2002; Ralston, *J Clin Endocrin Metab*. 87(6):2460-66, 2002).

Dickkopf-1 (Dkk-1) es un miembro de la familia de proteínas dickkopf que se ha demostrado que son reguladores negativos de la ruta de señalización canónica de Wnt, que tiene un papel central en el desarrollo y la formación de hueso (véanse, por ejemplo, Glinka et al., *Nature* 391:357-62 (1998); Fedi et al., *J Biol Chem* 274(27):19465-72 (1999); Zorn, *Curr Biol* 11:R592-95 (2001); y Krupnik et al., *Gene* 238: 301-13 (1999)). Dkk-1 inhibe la señalización Wnt a través de su correlación con los receptores de Wnt LRP5 o LRP6 y las proteínas kremen (véanse, por ejemplo, Bafico et al, *Nature Cell Biol* 3:683 (2001); Mao et al, *Nature* 411(17):321 (2001); Mao et al, *Nature* 417:664 (2002); y Semenov et al, *Curr Biol* 11:951-61 (2001). Por medio de la unión de LRP5 (LRP6) y proteínas kremen, Dkk-1 evita que LRP5 o LRP6 se asocien con miembros de la ruta Wnt y de ese modo evita la transducción de la señal mediada por Wnt, que a su vez da como resultado la inhibición de la formación de hueso.

LRP5 es una proteína clave en la regulación de la masa ósea (véanse, por ejemplo, Gong et al., *Cell* 107:513-23 (2001); Patel, *N Eng J Med* 346(20):1572 (2002)). Se ha identificado un trastorno recesivo autosómico caracterizado por una baja masa ósea (síndrome de osteoporosis-pseudoglioma, u "OPPG") que está causado por mutaciones de pérdida de función en LRP5 (Gong et al, 2001). Además, se ha demostrado que las mutaciones de ganancia de función en LRP5 dan como resultado una masa ósea elevada dominante autosómica en seres humanos (Little et al., *Am J Human Genetics*. 70 (1):11-19, 2002). Las mismas mutaciones en LRP5 que dan como resultado una masa ósea elevada pueden interferir en la capacidad de Dkk-1 para inhibir la señalización de LRP5 (véase, por ejemplo, Boyden et al., *N Eng J Med*. 346(20):1513-1521, 2002). De este modo, Dkk-1 se caracteriza apropiadamente por ser un regulador negativo del depósito óseo.

En vista de la implicación de Dkk-1 en la regulación de la formación de hueso y su papel en otras diversas enfermedades que están asociadas con la pérdida de hueso (p. ej., cáncer y diabetes), existe una necesidad de anticuerpos anti-Dkk-1 mejorados para uso terapéutico y para otros propósitos.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos aislados y fragmento inmunológicamente funcionales de los mismos que se unen específicamente a una proteína de Dkk-1 humana madura que consiste en los aminoácidos 32-266 del SEC ID NO: 2, en donde dicho anticuerpo se une a un epítipo que comprende dos bucles, estando formados dichos bucles por enlaces disulfuro y estando dichos bucles entre 220 y 237 del SEC ID NO: 2 y entre los residuos de cisteína 245 y 263 del SEC ID NO: 2.

Los anticuerpos o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos pueden comprender:

(a)

(i) una CDR1 de LC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO: 70; y

(ii) una CDR2 de LC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO: 72; y

(iii) una CDR3 de LC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO: 74; y

(b)

(i) una CDR1 de HC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO: 76; y

(ii) una CDR2 de HC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO: 78; y

(iii) una CDR3 de HC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO: 80.

En un aspecto relacionado, los anticuerpos aislados y los fragmentos inmunológicamente funcionales comprenden:

5 una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con el SEC ID NO: 84; y

una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con el SEC ID NO: 91.

10 De acuerdo con una realización preferida adicional, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos que compiten con los anticuerpos definidos anteriormente por la unión específica a un polipéptido Dkk-1.

En otro aspecto, la presente invención proporcionar un ácido nucleico que codifica

una CDR de la cadena ligera con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO: 70, 72 y/o 74; y/o

una CDR de la cadena pesada con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO: 70, 78 y/o 80,

en donde el ácido nucleico codifica un anticuerpo como se ha definido anteriormente.

15 La presente invención proporciona adicionalmente vectores de expresión que comprenden los respectivos ácidos nucleicos y células aisladas que comprenden los respectivos vectores de expresión.

20 Adicionalmente se proporcionan métodos para producir un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que comprende la etapa de cultivar las respectivas células. De acuerdo con una realización adicionalmente preferida de la presente invención se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo como se ha descrito anteriormente y un componente seleccionado del grupo que consiste en un tampón, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un portador, un agente solubilizador, un emulsionante y un conservante.

25 Los anticuerpos y los fragmentos inmunológicamente activos de los mismos descritos anteriormente también se pueden utilizar para la preparación de una composición farmacéutica para su uso en la reparación ósea o para tratar una enfermedad, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en artritis, un trastorno óseo y un cáncer que incrementa la actividad de los osteoclastos e induce la resorción ósea.

En aspectos relacionados, los anticuerpos y los fragmentos inmunológicamente activos de los mismos se pueden utilizar para la preparación de una composición farmacéutica para tratar a un paciente con cáncer que experimenta terapia con radiación o quimioterapia y para tratar el mieloma múltiple.

30 Breve descripción de las figuras

35 La Figura 1 muestra un diagrama de cintas que representa la estructura tridimensional de un segmento de Dkk-1 humana localizado cerca del extremo carboxi de la proteína. Todos los números de aminoácidos indicados en la figura corresponden a la secuencia de aminoácidos del SEC ID NO: 2. Las dos secuencias de péptidos representadas en la figura representan regiones que son importantes para que el anticuerpo monoclonal 11H10 se una específicamente a esta proteína. Se cree que los aminoácidos que se encuentran subrayados juegan un papel importante para la unión del anticuerpo a la proteína de Dkk-1. Los bucles que comprenden el epítipo están sombreados, estando uno de los dos bucles del epítipo sombreado ligeramente más oscuro que el otro bucle. Las porciones de color muy claro del diagrama de cintas representan partes del polipéptido que se cree que desempeñan un papel menor en la interacción de unión entre 11H10 y Dkk-1 humana.

40 Las Figuras 2A y 2B muestran resultados μ CT para ratones jóvenes y viejos tratados con 11H10 de rata. La Figura 2A es una representación gráfica del número trabecular a diferentes niveles de dosificación de 11H10 de rata (5, 10 o 20 mg/kg) tanto en ratones viejos (8,5 meses de edad) como en ratones jóvenes (6 semanas de edad) frente al vehículo (control negativo) y PTH (control positivo). La Figura 2B es un gráfico del perímetro endosteal a diferentes niveles de dosificación de 11H10 de rata (5, 10 o 20 mg/kg) en ratones viejos (8,5 meses de edad) frente a vehículo (control negativo) y PTH (control positivo).

45 Las Figuras 3A y 3B son gráficos que representan el porcentaje de cambio en la DMO en ratones ovariectomizados (OVX) 28 días después de ser tratados con 11H10 de rata (3, 10 o 30 mg/kg) frente a vehículo o PTH (100 mg/kg). Los ratones se utilizaron 5 meses después de la OVX. La Figura 3A muestra el cambio en la DMO en la tibia el día 28 con respecto al período inicial. La Figura 3B muestra el cambio en la DMO en la zona lumbar el día 28 con respecto al período inicial.

La Figura 4 es un gráfico del porcentaje de cambio en la DMO en ratones jóvenes tres semanas después de haberles administrado 11H10 RT IgG1 o 11H10 RT IgG2 con respecto a 11H10 de rata o PTH.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

5 A menos que se defina de otro modo en la presente memoria, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que son comúnmente entendidos por los expertos normales en la técnica. Adicionalmente, a menos que sea requerido por el contexto, los términos en singular incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los mecanismos de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritos en la presente memoria son aquellos bien conocidos y utilizados comúnmente en la técnica. Los métodos y mecanismos de la presente invención se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se comentan a lo largo de la presente memoria a menos que se indique lo contrario. Véanse, p. ej., Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989.) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990), que se incorporan a la presente memoria como referencia. Las reacciones enzimáticas y los mecanismos de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, según se consigue comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. La terminología utilizada en relación con, y los procedimientos de laboratorio y los mecanismos de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica descritos en la presente memoria son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se pueden utilizar mecanismos convencionales para las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formulación y la liberación, y el tratamiento de los pacientes.

25 Se entenderá que los siguientes términos utilizados en esta descripción, a menos que se indique de otro modo, tienen los siguientes significados:

Según se utiliza en la presente memoria "Dkk-1" incluye, por ejemplo, las formas nativas de rata, murinas y humanas de Dkk-1. Las secuencias de nucleótidos ilustrativas que codifican las proteínas de Dkk-1 humana y murina se muestran, respectivamente, en los SEC ID NO: 1 y 3; las secuencias de aminoácidos correspondientes se muestran, respectivamente, en los SEC ID NOS: 2 y 4. La proteína Dkk-1 humana (SEC ID NO: 2) tiene una secuencia líder que consiste en los aminoácidos 1-31 del SEC ID NO: 2. Una secuencia de la proteína Dkk-1 de rata ilustrativa aparece en el acceso de GenBank XP_219804. El término también incluye variantes de tales secuencias nativas que presentan una reacción cruzada desde el punto de vista inmunológico con estas proteínas nativas. Estas proteínas pueden inhibir la interacción entre LRP5 o LRP6 con Wnt. Una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica LRP5 humana se proporciona en el SEC ID NO: 5, y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en el SEC ID NO: 6. Una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica LRP6 humana se proporciona en el SEC ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en SEC ID NO: 8. El término también se puede referir a un fragmento de una forma nativa o variante de Dkk-1 que contiene un epítipo al que puede unirse específicamente un anticuerpo.

40 El término "polinucleótido" o "ácido nucleico", representa polímeros de cadena sencilla o de cadena doble. Los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de bases, tales como derivados de bromouridina e inosina, modificaciones de la ribosa, tales como 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones de la unión internucleótido tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato y fosforoamidato. El término incluye tanto las formas de cadena sencilla y doble.

El término "oligonucleótido" representa un polinucleótido que comprende 200 nucleótidos o menos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 bases de longitud. En otras realizaciones, los oligonucleótidos tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 a 40 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble, p. ej., para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos efectores o antisentido. Un oligonucleótido de la invención puede incluir una marca, incluyendo una radiomarca, una marca fluorescente, un hapteno o una marca antigénica, para los análisis de detección. Los oligonucleótidos de la invención se pueden usar, por ejemplo, como cebadores de PCR, cebadores de clonación o sondas de hibridación.

55 Una "molécula de ácido nucleico aislada" significa un ADN o ARN de origen genómico, ARNm, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos que no están asociados con todo o una porción de un polinucleótido con el cual se encuentra el polinucleótido aislado en la naturaleza, o está conectado a un polinucleótido al que no está conectado en la naturaleza. Para los fines de esta descripción, se debe entender que "una molécula de ácido nucleico que comprende" una secuencia de nucleótidos concreta, no incluye cromosomas intactos. Las moléculas de ácido nucleico aisladas "que comprenden" secuencias de ácido nucleico especificadas puede incluir, además de las

secuencias especificadas, secuencias codificantes para hasta diez o incluso hasta veinte proteínas diferentes o porciones de las mismas, o pueden incluir secuencias reguladoras conectadas operablemente que controlan la expresión de la región codificante de las secuencias de ácidos nucleicos citadas, y/o pueden incluir secuencias de vectores.

- 5 A menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de cualquier secuencia de polinucleótidos de cadena sencilla comentado en la presente memoria es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de las secuencias de polinucleótidos de doble cadena es referida como la dirección 5'. La dirección de adición 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes es referida como dirección de transcripción; las regiones de secuencia de la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que se encuentran 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN son referidas como "secuencias aguas arriba"; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que se encuentran 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN son referidas como "secuencias aguas abajo".

- 15 El término "secuencia de control" hace referencia a una secuencia de polinucleótido que puede afectar a la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las cuales está ligada. La naturaleza de tales secuencias de control puede depender del organismo anfitrión. En realizaciones concretas, las secuencias de control de procariotas pueden incluir un promotor, un sitio de unión ribosomal, y una secuencia de terminación de la transcripción. Por ejemplo, las secuencias de control para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para los factores de transcripción, secuencias intensificadoras de la transcripción, y la secuencia de terminación de la transcripción. Las "secuencias de control" de acuerdo con la invención pueden incluir secuencias líder y/o secuencias de compañeros de fusión.

El término "vector" significa cualquier molécula o entidad (p. ej., ácido nucleico, plásmido, bacteriófago o virus) utilizado para transferir información codificante de la proteína a una célula anfitriona.

- 25 El término "vector de expresión" o "constructo de expresión" hace referencia a un vector que es adecuado para la transformación de una célula anfitriona y contiene secuencias de ácidos nucleicos que dirigen o controlan (junto con la célula anfitriona) la expresión de una o más regiones codificantes heterólogas conectadas operativamente al mismo. Un constructo de expresión puede incluir, pero está limitado a, secuencias que afectan o controlan la transcripción, la traducción, y, si están presentes intrones, afectan al empalme de ARN de una región codificante conectada operablemente a la misma.

- 30 Según se utiliza en la presente memoria, "conectado operablemente" significa que los componentes a los que se aplica el término están en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia de control en un vector que está "conectado operablemente" a una secuencia codificante de la proteína está ligada al mismo, de modo que la expresión de la secuencia codificante de la proteína se consigue en condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias de control.

- 35 El término "célula anfitriona" significa una célula que ha sido transformada, o es susceptible de ser transformada, con una secuencia de ácido nucleico y de ese modo expresa un gen de interés. El término incluye la progenie de la célula parental, ya sea la progenie idéntica o no en morfología o en composición genética a la célula parental original, siempre que el gen de interés esté presente.

- 40 El término "transducción" significa la transferencia de genes de una bacteria a otra, generalmente por bacteriófagos. "Transducción" hace referencia también a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucarióticas por retrovirus.

- 45 El término "transfección" significa la captación de ADN foráneo o exógeno por una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando el ADN exógeno ha sido introducido dentro de la membrana celular. Diversos mecanismos de transfección son bien conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria. Véanse, por ejemplo, Graham y col., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Id.; Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; y Chu et al., 1981, *Gene* 13:197. Tales técnicas se pueden utilizar para introducir uno o más radicales de ADN exógeno en células anfitrionas adecuadas.

- 50 El término "transformación" hace referencia a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula ha sido transformada cuando ha sido modificada para que contenga un nuevo ADN o ARN. Por ejemplo, una célula es transformada cuando se modifica genéticamente a partir de su estado nativo mediante la introducción de nuevo material genético a través de la transfección, transducción, u otras técnicas. Después de la transfección o transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose físicamente en el cromosoma de la célula, o se puede mantener transitoriamente como un elemento episómico sin ser replicado, o puede replicarse independientemente en forma de un plásmido. Se considera que una célula ha sido "transformada de forma estable" cuando el ADN transformante se replica con la división de la célula.

- 55 Los términos "polipéptido" o "proteína" significan una macromolécula que tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína nativa, es decir, una proteína producida por una célula de origen natural y no recombinante, o producida por una célula diseñada mediante ingeniería genética o recombinante, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen delecciones, adiciones, y/o sustituciones de uno o más

aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos "polipéptido" y "proteína" abarcan específicamente y anticuerpos anti-Dkk-1, o secuencias que tienen delecciones, adiciones, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un anticuerpo anti-Dkk-1. El término "fragmento de polipéptido" hace referencia a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal, una delección carboxi terminal, y/o delecciones internas en comparación con la proteína nativa completa. Tales fragmentos también pueden contener aminoácidos modificados en comparación con la proteína nativa. En ciertas realizaciones, los fragmentos tienen aproximadamente de 5 a 500 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, los fragmentos pueden tener al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, o 450 aminoácidos de longitud. Los fragmentos de polipéptidos útiles para la presente invención incluyen fragmentos inmunológicamente funcionales de anticuerpos, incluyendo dominios de unión. En el caso del anticuerpo anti-Dkk-1, los fragmentos útiles incluyen, pero no se limitan a una región CDR, un dominio variable de una cadena pesada o ligera, una porción de una cadena de anticuerpo o simplemente su región variable incluyendo dos CDR, y similares.

El término "proteína aislada" referido en la presente memoria significa que una proteína sujeto (1) está libre de al menos algunas otras proteínas con las que normalmente se encontraría, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma procedencia, p. ej., de la misma especie, (3) es expresada por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono, u otros materiales con los que está asociada en la naturaleza, (5) está asociada operablemente (mediante interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociada en la naturaleza, o (6) no existe en la naturaleza. El ADN genómico, el ADNc, el ARNm u otro ARN, de origen sintético, o cualquier combinación de los mismos pueden codificar tal proteína aislada. Preferiblemente, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían en su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación u otro uso.

Una "variante" de un polipéptido (p. ej., un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácidos se insertan, eliminan y/o se sustituyen en la secuencia de aminoácidos con respecto a otra secuencia de polipéptido. Las variantes de la invención incluyen proteínas de fusión.

Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido (p. ej., un anticuerpo) que ha sido modificado químicamente de alguna forma distinta de las variantes de inserción, delección, o sustitución, p. ej., por medio de conjugación a otro radical químico.

El término "anticuerpo" hace referencia a una inmunoglobulina intacta de cualquier isotipo, o un fragmento de la misma que puede competir con el anticuerpo intacto por la unión específica al antígeno diana, e incluye anticuerpos quiméricos, humanizados, y biespecíficos. Un anticuerpo intacto generalmente comprenderá al menos dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas, pero en algunos casos puede incluir menos cadenas tales como los anticuerpos de origen natural de los camélidos que pueden comprender solamente las cadenas pesadas. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden derivarse exclusivamente de una sola fuente, o pueden ser "quiméricos", es decir, las diferentes porciones del anticuerpo pueden derivar de dos anticuerpos diferentes. Por ejemplo, las regiones CDR se pueden obtener de rata o tener origen murino, mientras que la región marco de la región V se obtiene de una fuente animal diferente, tal como un ser humano. Los anticuerpos o los fragmentos de unión de la invención se pueden producir en hibridomas, mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" incluye, además de los anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas, derivados, variantes, fragmentos, y muteínas de los mismos, cuyos ejemplos se describen a continuación.

El término "cadena ligera" incluye una cadena ligera completa y fragmentos de la misma que tienen una secuencia de la región variable suficiente para conferir especificidad de unión. Una cadena ligera completa incluye un dominio de la región variable, V_L , y un dominio de la región constante, C_L . El dominio de la región variable de la cadena ligera está en el extremo amino del polipéptido. Las cadenas ligeras de acuerdo con la invención incluyen cadenas kappa y cadenas lambda.

El término "cadena pesada" incluye una cadena pesada completa y fragmentos de la misma que tienen una secuencia de la región variable suficiente para conferir especificidad de unión. Una cadena pesada completa incluye un dominio de la región variable, V_H , y tres dominios de la región constante, C_{H1} , C_{H2} , y C_{H3} . El dominio V_H está en el extremo amino del polipéptido, y los dominios C_H están en el extremo carboxilo, siendo C_{H3} el más cercano al extremo -COOH. Las cadenas pesadas de acuerdo con la invención pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgG (incluyendo los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluyendo los subtipos IgA e IgA₂), IgM e IgE.

El término "fragmento inmunológicamente funcional" (o simplemente "fragmento") de una cadena de inmunoglobulina, según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una porción de una cadena ligera o una cadena pesada de anticuerpo que carece al menos de algunos de los aminoácidos presentes en una cadena completa, pero que es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Tales fragmentos son biológicamente activos ya que se unen específicamente al antígeno diana y pueden competir con anticuerpos intactos por la unión específica a un determinado epítipo. En un aspecto de la invención, tal fragmento conservará al menos una CDR presente en la cadena ligera o pesada completa, y en algunas realizaciones comprenderá una única cadena pesada y/o cadena ligera o porción de las mismas. Estos fragmentos biológicamente activos se pueden producir mediante

- técnicas de ADN recombinante, o se pueden producir mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de inmunoglobulina inmunológicamente funcionales de la invención incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio y anticuerpos de cadena sencilla, y puede derivar de cualquier fuente de mamífero, incluyendo pero sin limitarse a, ratón, rata, camélido o conejo. Se contempla adicionalmente que una porción funcional de los anticuerpos de la invención, por ejemplo, una o más CDR, pueda estar unida covalentemente a una segunda proteína o una molécula pequeña para crear un agente terapéutico dirigido a una diana concreta en el organismo, poseyendo propiedades terapéuticas bifuncionales, o teniendo una vida media en suero prolongada.
- Un "fragmento Fab" se compone de una cadena ligera y regiones C_{H1} y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.
- Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios C_{H1} y C_{H2} de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos por medio de dos o más enlaces disulfuro y por medio de interacciones hidrófobas de los dominios CH3.
- Un "fragmento Fab'" contiene una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene el dominio V_H y el dominio C_{H1} y también la región entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de manera que se pueden formar un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')₂.
- Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de manera que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento F(ab')₂ se compone por lo tanto de dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por medio de un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.
- La "región Fv" comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras, pero carece de las regiones constantes.
- Los "anticuerpos de cadena sencilla" son moléculas Fv en las que las regiones variables de la cadena pesada y ligera han sido conectadas por un conector flexible para formar una sola cadena polipeptídica, que forma una región de unión a antígeno. Los anticuerpos de cadena sencilla se comentan con detalle en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 88/01649 y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.946.778 y 5.260.203, cuyas descripciones se incorporan como referencia.
- Un "anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solo la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones V_H se unen covalentemente con un conector peptídico para crear un anticuerpo de dominio bivalente. Los dos regiones V_H de un anticuerpo de dominio bivalente pueden elegir como diana el mismo o diferentes antígenos.
- Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión al antígeno. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades antigénicas. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos (véase más abajo).
- Un "anticuerpo multiespecífico" es aquel que se dirige a más de un antígeno o epítopo.
- Un anticuerpo "biespecífico", de "especificidad dual" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido que tiene dos sitios de unión a antígeno diferentes. Los anticuerpos biespecíficos son una especie de anticuerpo multiespecífico y se pueden producir mediante una variedad de métodos, incluyendo, pero no limitados a, fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véanse, p. ej., Songsivilai y Lachmann (1990), *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Kostelny et al. (1992), *J. Immunol.* 148:1547-1553. Los dos sitios de unión de un anticuerpo biespecífico se unirán a dos epítopos diferentes, que pueden residir en la misma o diferentes dianas proteicas.
- El término "anticuerpo neutralizador" hace referencia a un anticuerpo que se une a un ligando, previene la unión del ligando a su compañero de unión e interrumpe la respuesta biológica que de otro modo resultaría de la unión del ligando a su compañero de unión. En la evaluación de la unión y la especificidad de un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo, un anticuerpo o fragmentos inhibirá sustancialmente la unión de un ligando a su compañero de unión cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de compañero de unión unido al ligando en al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más (medido en un análisis de unión competitiva *in vitro*). En el caso de los anticuerpos para Dkk-1, un anticuerpo neutralizador disminuirá la capacidad de Dkk-1 para unirse a LRP5 o LRP6, induciendo de ese modo un aumento medible en la actividad de Wnt.
- El término "compite" cuando se utiliza en el contexto de anticuerpos que compiten por el mismo epítopo significa la competición entre anticuerpos determinada mediante un análisis en el que el anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional a prueba impiden o inhiben la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común (p. ej., Dkk-1 o un fragmento del mismo). Se pueden utilizar numerosos tipos de análisis de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoanálisis directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoanálisis enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), análisis competitivo sándwich (véase, p. ej., Stahli et al (1983) *Methods in*

Enzymology 9:242-253); EIA con biotina-avidina directo en fase sólida (véase, p. ej., Kirkland et al., (1986) J. Immunol. 137:3614-3619), análisis de marcaje directo en fase sólida, análisis sándwich de marcaje directo en fase sólida (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press), RIA de marcaje directo en fase sólida utilizando la marca I-125 (véase, p. ej., Morel et al (1988) Molec. Immunol. 25:7-15); EIA con biotina-avidina directo en fase sólida (véase, p. ej., Cheung, et al. (1990) Virology 176:546-552); y RIA de marcaje directo (Moldenhauer et al. (1990) Scand. J. Immunol. 32:77-82). Típicamente, tal análisis implica el uso de un antígeno purificado unido a una superficie sólida o a células que portan cualquiera de éstos, una inmunoglobulina de ensayo no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unida a la superficie sólida o las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Por lo general, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados mediante el análisis competitivo (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido al anticuerpo de referencia para que se produzca impedimento estérico. Los detalles adicionales referentes a los métodos para determinar la unión competitiva se proporcionan en los ejemplos de la presente memoria. Normalmente, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En algún caso, la unión es inhibida en al menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 97% o más.

El término "antígeno" hace referencia a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse a agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo, y adicionalmente susceptible de ser utilizado en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos que son capaces de interactuar con anticuerpos diferentes.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o a un receptor de células T. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo que se dirige específicamente a ese antígeno, y cuando el antígeno es una proteína, incluye los aminoácidos específicos que entran en contacto directo con el anticuerpo. Muy a menudo, los epítopos residen en proteínas, pero en algunos casos pueden residir en otros tipos de moléculas, tales como ácidos nucleicos. Los determinantes epitópicos pueden incluir agrupamiento superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo o sulfonilo, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Generalmente, los anticuerpos específicos para un antígeno diana concreto reconocerán preferentemente un epítipo en el antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

Se dice que un anticuerpo de la invención "se une específicamente" a su antígeno diana cuando la constante de disociación (K_d) es $\leq 10^{-8}$ M. El anticuerpo se une específicamente al antígeno con una "alta afinidad" cuando la K_d es $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, y con una "afinidad muy alta" cuando la K_d es $\leq 5 \times 10^{-10}$ M. En una realización de la invención, el anticuerpo tiene una $K_d \leq 10^{-9}$ M y una velocidad de disociación de aproximadamente 1×10^{-4} /seg. En una realización de la invención, la velocidad de disociación es $< 1 \times 10^{-5}$. En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos se unirán a Dkk-1 humano con una K_d entre aproximadamente 10^{-8} M y 10^{-10} M, y en otra realización más se unirán con una $K_d \leq 2 \times 10^{-10}$.

El término "identidad" hace referencia a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptidos o dos o más moléculas de ácido nucleico, según se determina mediante alineamiento y comparación de las secuencias. "Porcentaje de identidad" significa el porcentaje de residuos idénticos entre los aminoácidos o nucleótidos de las moléculas comparadas y se calcula basándose en el tamaño de la más pequeña de las moléculas que se están comparando. Para estos cálculos, los espacios en los alineamientos (si los hubiera) deben ser tratados mediante un modelo matemático o un programa de informático concretos (es decir, un "algoritmo"). Los métodos que se pueden utilizar para calcular la identidad de los ácidos nucleicos o polipéptidos alineados incluyen los descritos en *Computational Molecular Biology*, (Lesk, A.M., ed.), 1988, Nueva York: Oxford University Press; *Biocomputing Informatics and Genome Projects*, (Smith, D.W., ed.), 1993, New York Academic Press; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, (Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Nueva York: Academic Press; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), 1991, Nueva York: M. Stockton Press; y Carrillo et al., 1988, *SIAM J. Applied Math.* 48:1073.

Al calcular el porcentaje de identidad, las secuencias que se están comparando se alinean de una manera que proporciona el mayor emparejamiento entre las secuencias. El programa informático utilizado para determinar el porcentaje de identidad es el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux et al, 1984, *Nucl Acid Res* 12:387; Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI). El algoritmo informático GAP se utiliza para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los cuales se va a determinar el porcentaje de identidad de secuencia. Las secuencias se alinean para un emparejamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos o nucleótidos (el "tramo emparejado", según se determina mediante el algoritmo). Se utilizan junto con el algoritmo una penalización de apertura del espacio (que se calcula como 3X la diagonal media, en donde la "diagonal media" es la media de la diagonal de la diagonal de la matriz de comparación que se está utilizando; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada emparejamiento de aminoácidos perfecto por la matriz de comparación concreta) y una penalización de prolongación del espacio (que es usualmente 1/10 veces la penalización de apertura del espacio), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62. En ciertas realizaciones,

también se utiliza con el algoritmo una norma matriz de comparación patrón (véase Dayhoff et al., 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. USA* 89: 10915-10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62).

Los parámetros recomendados para determinar el porcentaje de identidad para secuencias de polipéptidos o nucleótidos utilizando el programa GAP, son los siguientes:

Algoritmo: Needleman et al., 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-453;

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff et al., 1992, más arriba;

Penalización del espacio: 12 (pero sin penalización por espacios en los extremos)

Penalización por longitud del espacio: 4

Umbral de similitud: 0

Ciertos esquemas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el apareamiento de solamente una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta a pesar de que no exista una relación significativa entre las dos secuencias completas. En consecuencia, el método de alineamiento seleccionado (programa GAP) puede ajustarse si así se desea para dar como resultado un alineamiento que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Según se utiliza en la presente memoria, "sustancialmente puro" significa que la especie de molécula descrita es la especie predominante presente, es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la misma mezcla. En ciertas realizaciones, una molécula sustancialmente pura es una composición en la que la especie objeto comprende al menos 50% (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes en otras realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá al menos 80%, 85%, 90 %, 95%, o 99% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En otras realizaciones, la especie objeto se purifica hasta la homogeneidad esencial en donde las especies contaminantes no pueden ser detectadas en la composición por métodos de detección convencionales y por lo tanto la composición consiste en una única especie macromolecular detectable.

El término "osteopenia" hace referencia a un paciente con pérdida de hueso de al menos una desviación típica en comparación con un paciente patrón que se considera que tienen una densidad mineral ósea (DMO) normal. Para los fines de la presente invención, la medición se determina mediante Absorciometría de Rayos X de Energía Dual (DEXA) y la DMO del paciente se compara con un patrón de la misma edad y sexo (puntuación Z). En la determinación de la osteopenia, las mediciones de la DMO pueden tomarse de uno o más huesos.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a la cantidad de un anticuerpo anti-Dkk-1 determinada para producir una respuesta terapéutica en un mamífero. Tales cantidades terapéuticamente eficaces son determinadas fácilmente por un experto normal en la técnica.

"Aminoácido" incluye su significado normal en la técnica. Los veinte aminoácidos origen natural y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology - A Synthesis*, 2ª Edición, (E. S. Golub y D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991), incorporada a la presente memoria como referencia para cualquier fin. Los estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α -, α -disustituidos, N-alquil-aminoácidos, y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la invención. Los ejemplos de los aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en la presente memoria, la dirección hacia la izquierda es la dirección amino terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección carboxi terminal, de acuerdo con el uso y la convención normalizados.

II. Visión de conjunto

La presente invención proporciona composiciones novedosas que comprenden anticuerpos y sitios de unión a antígenos de inmunoglobulinas como se ha escrito anteriormente, que son específicos para Dkk-1 (p. ej., un polipéptido que consiste en los aminoácidos 32-266 del SEC ID NO: 2 o un polipéptido que consiste en los aminoácidos 32 a 272 del SEC ID NO: 4). Algunos de estos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden reaccionar de forma cruzada con Dkk-1 de varias fuentes de mamíferos, incluyendo Dkk-1 rata, ratón y humana. Algunos de los anticuerpos y fragmentos tienen una mayor afinidad por Dkk-1 de una especie que de otra (p. ej., algunos anticuerpos y fragmentos de tener mayor afinidad por Dkk-1 humana en comparación con Dkk-1 de rata o murina; otros anticuerpos tienen una mayor afinidad por Dkk-1 de rata o murina en comparación con Dkk-1 humana). La invención también proporciona anticuerpos neutralizadores novedosos, incluyendo anticuerpos quiméricos, humanizados, así como anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos que se unen a un

epítipo conformacional de Dkk-1 humana. También se describen los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos y fragmentos, así como los métodos para la expresión de los anticuerpos usando estos ácidos nucleicos. En otro aspecto, la invención se refiere a moléculas (p. ej., fragmentos inmunológicamente funcionales y polipéptidos) que son capaces de mostrar las propiedades de unión inmunológicas de los sitios de unión al antígeno de los anticuerpos.

Los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se describen en la presente memoria tienen una variedad de utilidades. Algunos de los anticuerpos y fragmentos, por ejemplo, son útiles en análisis de unión específica, purificación por afinidad de Dkk-1 o sus ligandos y en análisis de escrutinio para identificar otros antagonistas de la actividad de Dkk-1. Algunos de los anticuerpos se pueden utilizar para tratar diversas enfermedades que están asociadas con la actividad de Dkk-1. Algunos anticuerpos y fragmentos se pueden utilizar por lo tanto en una variedad de tratamientos relacionados con los huesos, tales como el aumento de la densidad mineral ósea, la síntesis de hueso nuevo, el tratamiento de la pérdida ósea sistémica (p. ej., erosiones óseas), la reparación del hueso, y tratamientos para diversas formas de artritis. Algunos anticuerpos también se pueden utilizar para aumentar la actividad de los osteoclastos e inducir la resorción ósea.

III. Anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales

Se proporciona una variedad de anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos como se ha descrito anteriormente. Estos pueden contener un dominio de unión a antígeno (p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio, inmunoadherencias, y polipéptidos con una región de unión a antígeno) y se unen específicamente a un polipéptido Dkk-1 (p. ej., un polipéptido Dkk-1 humano, de rata y/o murino). Algunos de los agentes, por ejemplo, son útiles en la inhibición de la unión de Dkk-1 a LRP5 y/o LRP6, y por lo tanto se pueden utilizar para estimular una o más de las actividades asociadas con la señalización de Wnt.

A. Estructura de anticuerpos de origen natural

Algunos de los agentes de unión que se proporcionan tienen la estructura típicamente asociada con los anticuerpos de origen natural. Las unidades estructurales de estos anticuerpos comprenden típicamente uno o más tetrámeros, cada uno compuesto de dos pareados idénticos de cadenas polipeptídicas, aunque algunas especies de mamíferos también producen anticuerpos que tienen solamente una única cadena pesada. En un anticuerpo típico, cada par o pareado incluye una cadena "ligera" completa (en ciertas realizaciones, aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" completa (en ciertas realizaciones, aproximadamente 50-70 kDa). Cada cadena de inmunoglobulina individual está compuesta de varios "dominios de inmunoglobulina", que consisten cada uno en aproximadamente 90 a 110 aminoácidos y que expresan un patrón de plegamiento característico. Estos dominios son las unidades básicas de las que están compuestos los polipéptidos anticuerpo. La porción amino-terminal de cada cadena incluye típicamente un dominio variable que es responsable del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal está más conservada evolutivamente que el otro extremo de la cadena y es referida como "región constante" o "región C". Las cadenas ligeras humanas se clasifican generalmente como cadenas ligeras kappa y lambda, y cada una de ellas contiene un dominio variable y un dominio constante. Las cadenas pesadas se clasifican típicamente como cadenas mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y éstas definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. La IgG tiene varios subtipos, incluyendo, pero sin limitarse a, IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄. Los subtipos de IgM incluyen IgM₁ e IgM₂. Los subtipos de IgA incluyen IgA₁ e IgA₂. En los seres humanos, los isotipos IgA e IgD contienen cuatro cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras; los isotipos IgG e IgE contienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y el isotipo IgM contiene cinco cadenas pesadas y cinco cadenas ligeras. La región C de la cadena pesada comprende típicamente uno o más dominios que pueden ser responsables de la función efectora. El número de dominios de la región constante de la cadena pesada dependerá del isotipo. Las cadenas pesadas de IgG, por ejemplo, contienen cada una tres dominios de la región C conocidos como C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los anticuerpos que se proporcionan pueden tener cualquiera de estos isotipos y subtipos. En ciertas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-Dkk-1 es del subtipo a IgG₁, IgG₂ o IgG₄.

En las cadenas ligeras y pesadas completas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, p. ej., *Fundamental Immunology*, 2^a ed., Cap. 7 (Paul, W., ed.) 1989, Nueva York: Raven Press (incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad para todos los propósitos). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman típicamente el sitio de unión al antígeno.

Las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulinas exhiben generalmente la misma estructura general, que comprende regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, más a menudo denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par de cadena pesada /cadena ligera mencionado anteriormente están alineadas típicamente por las regiones marco para formar una estructura que se une específicamente a un epítipo específico de la proteína diana (por ejemplo, Dkk-1). Desde el extremo N-terminal al C-terminal, las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de origen natural conforman ambas típicamente el siguiente orden de estos elementos: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Se ha ideado un sistema de numeración para asignar números a los aminoácidos que ocupan las posiciones en cada uno de estos dominios. Este sistema de numeración se define en *Kabat Sequences of Proteins of*

Immunological Interest (1987 y 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md), o Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia et al, 1989, *Nature* 342: 878-883.

Los ejemplos específicos de algunas de las cadenas ligeras y pesadas completas de los anticuerpos que se proporcionan y sus correspondientes secuencias de nucleótidos y aminoácidos se resumen en la Tabla 1.

5

Tabla 1: Cadenas ligera y pesada

Designación Interna	Nombre Abrev.	Tipo de Cadena	Secuencia de NT (SEC ID NO :)	Secuencia de AA (SEC ID NO :)
11H10	L1	Ligera	81	82
11H10 CR	L2	Ligera	25	26
11H10 A1D	L3	Ligera	29	30
11H10	H1	Pesada	88	89
11H10 RT IgG1	H2	Pesada	33	34
11H10 ATT IgG1	H3	Pesada	37	38
11H10 RT IgG2	H4	Pesada	41	42
11H10 LT IgG2	H5	Pesada	45	46
11H10 SKLT IgG2	H6	Pesada	49	50
11H10 D3A IgG2	H7	Pesada	53	54
11H10 D23A IgG2	H8	Pesada	57	58
11H10 D32A IgG2	H9	Pesada	61	62
11H10 D89A IgG2	H10	Pesada	65	66

Cada una de las cadenas ligeras enumeradas en la Tabla 1 se puede combinar con cualquiera de las cadenas pesadas que se muestran en la Tabla 1 para formar un anticuerpo. Los ejemplos de tales combinaciones incluyen L1 combinada con H1-H10 o L2 combinada con H1-H10 y L3 combinada con H1-H10 (es decir, L1H1, L1H2, L1H3, L1H4, L1H5, L1H6, L1H7, L1H8, L1H9, L1H10, L2H1, L2H2, L2H3, L2H4, L2H5, L2H6, L2H7, L2H8, L2H9, L2H10, L3H1, L3H2, L3H3, L3H4, L3H5, L3H6, L3H7, L3H8, L3H9 y L3H10. En algunos casos, los anticuerpos incluyen al menos una cadena pesada y una cadena ligera de las enumeradas en la Tabla 1. En otros casos, los anticuerpos contienen dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Como ejemplo, un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional puede incluir dos cadenas ligeras L1 y dos cadenas pesadas H1, o dos cadenas ligeras L2 y dos cadenas pesadas H3, o dos cadenas ligeras L2 y dos cadenas pesadas H4 o dos L2 y dos cadenas pesadas H5 y otras combinaciones similares de pares de cadenas ligeras y pares de cadenas pesadas enumeradas en la Tabla 1.

Como ejemplo específico de tales anticuerpos, en una realización, el anticuerpo anti-Dkk-1 es un anticuerpo monoclonal derivado de ratas. Los anticuerpos ilustrativos capaces de unirse al epítipo conformacional anteriormente mencionado son los anticuerpos monoclonales 11H10 y 1F11 (véanse, los ejemplos de más abajo), cada uno de los cuales comprende una cadena ligera y una cadena pesada. La cadena ligera completa de 11H10 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEC ID NO: 9, y la cadena pesada completa de 11H10 por la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEC ID NO: 11. La secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada correspondientes de 11H10 se muestran, respectivamente, en los SEC ID NO: 10 y 12. Los residuos 1-20 del SEC ID NO: 10 y los residuos 1-19 del SEC ID NO: 12 corresponden a las secuencias señal de estas cadenas ligera y pesada de 11H10, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera sin la secuencia señal se muestra en el SEC ID NO: 82, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que carece de la secuencia señal se muestra en el SEC ID NO: 89.

De este modo, en un aspecto de la realización anterior, la cadena pesada puede consistir en los aminoácidos 20-465 del SEC ID NO: 12 (es decir, H1, correspondiente al SEC ID NO: 89), y en otro aspecto de esta realización, la cadena ligera puede consistir de los aminoácidos 21-234 del SEC ID NO: 10 (es decir, L1, correspondiente al SEC ID NO: 82). En otro aspecto de esta realización, el anticuerpo comprende tanto una cadena pesada que consiste en los aminoácidos 20-465 del SEC ID NO: 12 como una cadena ligera consiste en los aminoácidos 21-234 del SEC ID

NO: 10. En algunos casos, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas idénticas que consisten cada una en los aminoácidos 20-465 del SEC ID NO: 12 y dos cadenas ligeras idénticas que consisten cada una en los aminoácidos 21-234 del SEC ID NO: 10. Otro ejemplo específico es un anticuerpo que incluye la cadena ligera L2 (SEC ID NO: 26) y la cadena pesada H2 (SEC ID NO: 34). Las secuencias codificantes para estas cadenas ligera y pesada se presentan, respectivamente, en los SEC ID NO: 25 y 33. Estos anticuerpos pueden incluir dos cadenas pesadas y ligeras idénticas. Las otras cadenas pesadas y cadenas ligeras enumeradas en la Tabla 1 se pueden combinar de una manera similar.

Otros anticuerpos que se proporcionan son variantes de anticuerpos formados por la combinación de las cadenas pesadas y ligeras que se muestran en la Tabla 1 y comprenden cadenas ligeras y/o pesadas que tienen cada una identidad de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% con las secuencias de aminoácidos de estas cadenas. En algunos casos, tales anticuerpos incluyen al menos una cadena pesada y una cadena ligera, mientras que en otros casos tales formas variantes contienen dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

B. Dominios variables de anticuerpos

También se proporcionan anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en VL1, VL2, VL3 y/o una región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en VH1-VH10 como se muestra en la Tabla 2 a continuación, y fragmentos, derivados, muteínas y variantes inmunológicamente funcionales de estas regiones variables de la cadenas ligera y la cadena pesada.

Los anticuerpos de este tipo se pueden designar generalmente por la fórmula "VLxVHy", donde "x" es el número de la región variable de la cadena ligera e "y" corresponde al número de la región variable de la cadena pesada que se enumera en la Tabla 2. En general, x e y son cada uno 1 o 2.

Tabla 2: regiones variables

Designación interna	Nombre Abrev.	Tipo de Cadena	Secuencia de NT (SEC ID NO :)	Secuencia de AA (SEC ID NO :)
11H10	VL1	Ligera	83	84
11H10 CR	VL2	Ligera	27	28
11H10 A1D	VL3	Ligera	31	32
11H10	VH1	Pesada	90	91
11H10 RT IgG1	VH2	Pesada	35	36
11H10 ATT IgG1	VH3	Pesada	39	40
11H10 RT IgG2	VH4	Pesada	43	44
11H10 LT IgG2	VH5	Pesada	47	48
11H10 SKLT IgG2	VH6	Pesada	51	52
11H10 D3A IgG2	VH7	Pesada	55	56
11H10 D23A IgG2	VH8	Pesada	59	60
11H10 D32A IgG2	VH9	Pesada	63	64
11H10 D89A IgG2	VH10	Pesada	67	68

De este modo, VL2VH1 hace referencia a un anticuerpo con un dominio de la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de VL2 y una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de VH1. Los anticuerpos que se proporcionan por tanto, incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen la siguiente forma: VL1VH1, VL1VH2, VL1VH3, VL1VH4, VL1VH5, VL1VH6, VL1VH7, VL1VH8, VL1VH9, VL1VH10, VL2VH1, VL2VH2, VL2VH3, VL2VH4, VL2VH5, VL2VH6, VL2VH7, VL2VH8, VL2VH9, VL2VH10, VL3VH1, VL3VH2, VL3VH3, VL3VH4, VL3VH5, VL3VH6, VL3VH7, VL3VH8, VL3VH9, y VL3VH10. En algunos casos, los anticuerpos anteriores incluyen dos dominios de la región variable de la cadena ligera y dos dominios de la región variable de la cadena pesada (por ejemplo, VL1₂VH1₂ etc.).

Como ejemplo específico de tales anticuerpos, ciertos anticuerpos o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos comprenden la región variable de la cadena ligera o la región variable de la cadena pesada de 11H10,

en donde la región variable de la cadena ligera consiste en los aminoácidos 21-127 del SEC ID NO: 10 (es decir, VL1, correspondiente al SEC ID NO: 84) y la región variable de la cadena pesada consiste en los aminoácidos 20-139 del SEC ID NO: 12 (es decir, VH1, correspondiente al SEC ID NO: 91). En un aspecto de esta realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas.

- 5 También se proporciona, por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que consiste en los aminoácidos 21-127 de la SEC ID NO: 10 o un fragmento unión al antígeno o uno inmunológicamente funcional del mismo que comprende adicionalmente una región variable de la cadena pesada que consiste en los aminoácidos 20-139 del SEC ID NO: 12.

- 10 Ciertos anticuerpos comprenden un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de un dominio variable de la cadena ligera seleccionada entre L1, L2 o L3 en solo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos de aminoácidos, en donde cada una de tales diferencias de secuencia es independientemente una delección, una inserción o una sustitución de un aminoácido. La región variable de la cadena ligera en algunos anticuerpos comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% con las secuencias de aminoácidos de la
15 región variable de la cadena ligera de VL1, VL2 o VL3.

- Algunos anticuerpos que se proporcionan comprenden un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del dominio variable de la cadena pesada seleccionada entre H1-H10 en sólo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos de aminoácidos, en donde cada una de tales diferencias de secuencia es independientemente una delección, una inserción o una sustitución de un
20 aminoácido. La región variable de la cadena pesada en algunos anticuerpos comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% con las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6, VH7, VH8, VH9; VH10. Sin embargo, otros anticuerpos o fragmentos inmunológicamente funcionales incluyen formas variantes de una cadena ligera variante y una cadena pesada variante como se acaba de describir.

25 C. CDR de anticuerpos

- Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y las regiones marco (FR) de un anticuerpo dado se pueden identificar usando el sistema descrito por Kabat et al. en SECuencias of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication Núm. 91-3242, 1991. Ciertos anticuerpos
30 que se describen en la presente memoria comprenden una o más secuencias de aminoácidos que son idénticas o tienen una identidad de secuencia sustancial con las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR como se resume en la Tabla 3.

Tabla 3: CDR

Cadena	CDR	Secuencia de NT (SEC ID NO:)	Secuencia de AA
Ligera	CDR1	69 o 85	LASEDIYSDLA (SEC ID NO: 70)
Ligera	CDR2	71 o 86	NANSLQN (SEC ID NO: 72)
Ligera	CDR3	73 o 87	QQYNNYPPT (SEC ID NO: 74)
Pesada	CDR1	75 o 92	DYAMA (SEC ID NO: 76)
Pesada	CDR2	77 o 93	TIIYDGSSTYYRDSVKG (SEC ID NO: 78)
Pesada	CDR3	79 o 94	GLGIATDYFDY (SEC ID NO: 80)

- Los anticuerpos y los fragmentos funcionales inmunológicos que se proporcionan pueden incluir uno, dos, tres, cuatro, cinco o las seis CDR enumeradas anteriormente. Algunos anticuerpos o fragmentos incluyen tanto la CDR3
35 de la cadena ligera como la CDR3 de la cadena pesada. Ciertos anticuerpos tienen formas variantes de las CDR enumeradas en la Tabla 3, teniendo una o más (es decir, 2, 3, 4, 5 o 6) de cada una de las CDR una identidad de secuencia de al menos 80%, 85%, 90% o 95% con una secuencia de CDR enumerada en la Tabla 3. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento puede incluir tanto una CDR3 de la cadena ligera y una CDR3 de la cadena pesada que

tienen cada una identidad de secuencia de al menos 80%, 85%, 90% o 95% con la secuencia de la CDR3 de la cadena ligera y la CDR3 de la cadena pesada, respectivamente, enumeradas en la Tabla 3. Las secuencias de CDR de algunos de los anticuerpos que se proporcionan también pueden diferir de las secuencias de CDR enumeradas en la Tabla 3 de manera que la secuencia de aminoácidos para cualquier CDR dada difiere de la secuencia enumerada en la Tabla 3 en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos. Las diferencias de las secuencias enumeradas son por lo general sustituciones conservativas (véase más adelante).

Como ejemplo específico, los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan pueden comprender una o más de las siguientes secuencias de CDR de la cadena ligera de 11H10:

CDR1: aminoácidos 44-54 del SEC ID NO: 10, que también corresponde al SEC ID NO: 70 (codificado por los nucleótidos 130-162 del SEC ID NO: 9 (SEC ID NO: 85) o SEC ID NO: 69);

CDR2: aminoácidos 70-76 del SEC ID NO: 10, que también corresponde al SEC ID NO: 72 (codificado por los nucleótidos 208-228 del SEC ID NO: 9 (SEC ID NO: 86) o SEC ID NO: 71);

CDR3: los aminoácidos 109-117 de la SEC ID NO: 10, que también corresponde al SEC ID NO: 74 (codificado por los nucleótidos 325-351 del SEC ID NO: 9 (SEC ID NO: 87) o SEC ID NO: 73);

Los anticuerpos y fragmentos de inmunoglobulina inmunológicamente funcionales adicionales de la invención puede comprender una o más de las siguientes secuencias de CDR de la cadena pesada de 11H10:

CDR1: aminoácidos 50-54 del SEC ID NO: 12, que también corresponde al SEC ID NO: 76 (codificado por los nucleótidos 148-162 del SEC ID NO: 11 (SEC ID NO: 92) o SEC ID NO: 75);

CDR2: aminoácidos 69-85 del SEC ID NO: 12, que también corresponde al SEC ID NO: 78 (codificado por los nucleótidos 205-255 del SEC ID NO: 11 (SEC ID NO: 93) o SEC ID NO: 77);

CDR3: los aminoácidos 118-128 de la SEC ID NO: 12, que también corresponde al SEC ID NO: 80 (codificado por los nucleótidos 352-384 del SEC ID NO: 11 (SEC ID NO: 94) o el SEC ID NO: 79).

Los polipéptidos que comprenden una o más de las CDR de la cadena ligera o pesada se pueden producir mediante el uso de un vector adecuado para expresar los polipéptidos en una célula anfitriona adecuada como se describe con más detalle a continuación.

Las regiones variables de la cadena pesada y ligera y las CDR que se describen en la Tabla 2 y 3 se pueden utilizar para preparar cualquiera de los diferentes tipos de fragmentos inmunológicamente funcionales que se conocen en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, anticuerpos de dominio, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena sencilla y scFv.

D. Anticuerpos y epítopos de unión

Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítipo en de los residuos especificados, tal como Dkk-1, por ejemplo, lo que se quiere decir es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que consiste en los residuos especificados (p. ej., un segmento especificado de Dkk-1). Tal anticuerpo no entra necesariamente en contacto con cada residuo en de Dkk-1. Ni cada sustitución o delección de un único aminoácido en Dkk-1 afectan necesariamente de manera significativa a la afinidad de unión. La especificidad de epítipo de un anticuerpo se puede determinar de diferentes maneras. Un enfoque, por ejemplo, implica someter a ensayo una colección de péptidos solapantes de aproximadamente 15 aminoácidos que abarcan la secuencia de Dkk-1 y que difiere en incrementos de un pequeño número de aminoácidos (p. ej., 3 aminoácidos). Los péptidos se inmovilizan en los pocillos de una placa de microtitulación. La inmovilización se puede efectuar mediante biotinilación de un extremo de los péptidos. Opcionalmente, se pueden biotinar diferentes muestras del mismo péptido en el extremo N y C e inmovilizarlas en pocillos separados con fines comparativos. Esto resulta útil para la identificación de anticuerpos específicos de los extremos. Opcionalmente, se pueden incluir péptidos adicionales que terminan en un aminoácido concreto de interés. Este enfoque es útil para la identificación de anticuerpos específicos del extremo para fragmentos internos de Dkk-1. Un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional se escruta para determinar la unión específica a cada uno de los diversos péptidos. El epítipo se define como el que aparece con un segmento de aminoácidos que es común a todos los péptidos para los cuales el anticuerpo muestra una unión específica. Los detalles relativos a un enfoque específico para la definición de un epítipo se expone en el Ejemplo 6.

También se proporcionan anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos que se unen a un epítipo conformacional que se encuentra en la porción carboxi terminal de Dkk-1 (véase la Figura 1). El extremo carboxi de Dkk-1 contiene varios residuos de cisteína que forman un conjunto de enlaces disulfuro que crea varios bucles. La invención proporciona anticuerpos que se unen a dos de estos bucles, neutralizando así la capacidad de Dkk-1 para suprimir la actividad de Wnt. Los anticuerpos ilustrativos capaces de unirse al epítipo conformacional antes mencionado son los anticuerpos monoclonales 11H10 y 1F11, cada uno de los cuales comprende una cadena ligera y una cadena pesada. La cadena ligera completa de 11H10 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEC ID NO: 9, y la cadena pesada completa de 11H10 por la secuencia de nucleótidos mostrada en

el SEC ID NO: 11. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada correspondientes de 11H10 (incluyendo las secuencias señal) se muestran, respectivamente, en los SEC ID NOS: 10 y 12. Las formas maduras sin las secuencias señal corresponden a los SEC ID NO: 82 y 89.

El epítipo que comprende estos dos bucles está formado por enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína 220 y 237 del SEC ID NO: 2 y entre los residuos de cisteína 245 y 263 del SEC ID NO: 2. El cuerpo de los dos bucles que forman el epítipo incluye por lo tanto los aminoácidos 221-236 y 246-262 del SEC ID NO: 2. Los segmentos dentro de este bucle que están implicados en la unión incluyen los aminoácidos 221-229 del SEC ID NO: 2 y los aminoácidos 246-253 del SEC ID NO: 2. De este modo, ciertos anticuerpos y fragmentos que se proporcionan en la presente memoria se unen específicamente a la región o las regiones anteriores. Algunos de los anticuerpos y fragmentos, por ejemplo, se unen a un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos 221 a 262 del SEC ID NO: 2.

En un aspecto de la invención, se proporcionan péptidos que comprenden o consisten en los aminoácidos 221-229 y/o 246-253 del SEC ID NO: 2. Otros péptidos comprenden o consisten en los aminoácidos 221-236 y/o 246-262 del SEC ID NO: 2. Otros péptidos que se proporcionan comprenden o consisten en la región de los aminoácidos 221 a 262 del SEC ID NO: 2 o 221-253 del SEC ID NO: 2. Tales péptidos son más cortos que la secuencia de la proteína completa de una Dkk-1 nativa (p. ej., los péptidos pueden incluir una o más de las regiones anteriores y tener 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150, o 200 aminoácidos de longitud). Estos péptidos pueden fusionarse con otro péptido para aumentar la inmunogenicidad y así estar en forma de una proteína de fusión.

E. Anticuerpos competidores

También se proporcionan anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos que compiten con uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales ilustrados por la unión específica a Dkk-1. Tales anticuerpos y fragmentos también pueden unirse al mismo epítipo que uno de los anticuerpos ilustrados. Se espera que los anticuerpos y los fragmentos que compiten con o se unen al mismo epítipo que el anticuerpo o fragmento ilustrado muestren propiedades funcionales similares. Los anticuerpos y fragmentos ilustrados incluyen los descritos anteriormente, incluyendo aquellos con las cadenas pesada y ligera, los dominios de la región variable y las CDR enumerados en las Tablas 1-3. Los anticuerpos o fragmentos inmunológicamente funcionales competidores pueden incluir aquellos que se unen al epítipo descrito en la sección sobre anticuerpos y epítopos de más arriba.

Como ejemplo específico, algunos anticuerpos o fragmentos competidores incluyen aquellos que se unen específicamente a una proteína Dkk-1 que consiste en los aminoácidos 32 a 266 del SEC ID NO: 2 o los aminoácidos 32 a 272 del SEC ID NO: 4 y pueden evitar o reducir la unión a Dkk-1 humana de un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, en donde dichas cadenas pesadas consisten en los aminoácidos 20-465 del SEC ID NO: 12 y dichas cadenas ligeras consisten en los aminoácidos 21-234 del SEC ID NO: 10. Otros anticuerpos competidores evitan o reducen la unión a Dkk-1 humana de un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, tales como las enumeradas en la Tabla 1.

F. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos que se proporcionan incluyen anticuerpos monoclonales que se unen a Dkk-1. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando cualquier mecanismo conocido en la técnica, p. ej., inmortalizando las células de bazo recogidas de animales transgénicos después de la finalización del programa de inmunización. Las células del bazo se pueden inmortalizar usando cualquier mecanismo conocido en la técnica, p. ej., fusionándolas con células de mieloma para producir hibridomas. Las células de mieloma para su uso en los procedimientos de fusión para producir hibridomas son preferiblemente no productoras de anticuerpos, tienen alta eficacia de fusión, y deficiencias enzimáticas que las hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento solamente de las células fusionadas deseadas (hibridomas). Los ejemplos de líneas celulares adecuadas para uso en fusiones de ratón incluyen SP-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, SP210-GA14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; los ejemplos de las líneas celulares utilizadas en las fusiones de rata incluyen R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras líneas celulares útiles para las fusiones celulares son U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6.

En algunos casos, se produce una línea celular de hibridoma inmunizando un animal con un inmunógeno Dkk-1; cosechando las células de bazo del animal inmunizado; fusionando las células de bazo cosechadas con una línea celular de mieloma, generando así células de hibridoma; establecimiento las líneas celulares de hibridoma a partir de las células de hibridoma, e identificando una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo que se une a un polipéptido Dkk-1. Tales líneas celulares de hibridoma, y anticuerpos monoclonales anti-Dkk-1 producidos por las mismas, están abarcados por la presente invención.

Los anticuerpos monoclonales secretados por una línea celular de hibridoma se pueden purificar utilizando cualquier mecanismo conocido en la técnica. Los hibridomas o mAb se pueden escrutar adicionalmente para identificar mAb

con propiedades concretas, tales como la capacidad de bloquear una actividad inducida por Wnt. Los ejemplos de tales escrutinios se proporcionan en los ejemplos siguientes.

G. Anticuerpos quiméricos y humanizados

También se proporcionan anticuerpos quiméricos y humanizados basados en las secuencias anteriores. Los anticuerpos monoclonales para su uso como agentes terapéuticos pueden ser modificados de diversas maneras antes de su uso. Un ejemplo es un anticuerpo "quimérico", que es un anticuerpo compuesto de segmentos de proteínas de diferentes anticuerpos que se unen covalentemente para producir cadenas ligeras o pesadas de inmunoglobulinas funcionales o porciones inmunológicamente funcionales de las mismas. En general, una porción de la cadena pesada y/o de la cadena ligera es idéntica u homóloga a una secuencia correspondiente en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la cadena o de las cadenas es o son idénticas u homólogas a una secuencia correspondiente en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos. Para los métodos referentes a los anticuerpos quiméricos, véanse, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6851-6855 (1985), que se incorporan a la presente como referencia. El injerto de CDR se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, y 5.530.101, que se incorporan todas a la presente como referencia para todos los propósitos.

En general, el objetivo de elaborar un anticuerpo quimérico es crear una quimera en la que se maximiza el número de aminoácidos de la especie del paciente pretendido. Un ejemplo es el anticuerpo "injertado con CDR", en el que el anticuerpo comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una especie concreta o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos concretas, mientras que el resto de la cadena o de las cadenas de anticuerpo es o son idénticas u homólogas a una secuencia correspondiente en los anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos. Para su uso en los seres humanos, a menudo se injertan la región V o CDR seleccionadas de un anticuerpo de roedor en un anticuerpo humano, reemplazando las regiones V o CDR de origen natural del anticuerpo humano.

Un tipo útil de anticuerpo quimérico es un anticuerpo "humanizado". Generalmente, un anticuerpo humanizado se produce a partir de un anticuerpo monoclonal producido inicialmente en un animal no humano. Ciertos residuos de aminoácidos en este anticuerpo monoclonal, típicamente en las porciones del anticuerpo que no son de reconocimiento de antígeno, se modifican para que sean homólogos a los residuos correspondientes en un anticuerpo humano del isotipo correspondiente. La humanización se puede realizar, por ejemplo, utilizando diversos métodos mediante la sustitución de al menos una parte de una región variable de roedor por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.585.089, y 5.693.762; Jones y col., 1986, *Nature* 321:522-25; Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323-27; Verhoeven et al., 1988, *Science* 239:1534-36).

En un aspecto de la invención, las CDR de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria (véase la Tabla 3) se injertan en las regiones marco (FR) de anticuerpos de la misma especie filogenética, o de una diferente. Por ejemplo, las CDR de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo 11H10 se pueden injertar en FR humanas consenso. Para crear FR humanas consenso, se pueden alinear las FR de varias secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas o cadenas ligeras humanas para identificar una secuencia de aminoácidos consenso. En otras realizaciones, las FR de la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo 11H10 se reemplazan por las FR de una cadena pesada o una cadena ligera diferentes. En un aspecto de la invención, los aminoácidos raros de las FR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-Dkk-1 no se reemplazan, mientras que el resto de los aminoácidos de la FR se reemplazan. Un "aminoácido raro" es un aminoácido específico que se encuentra en una posición en la que este aminoácido concreto no se encuentra generalmente en una FR. Alternativamente, las regiones variables injertadas del anticuerpo 11H10 se pueden utilizar con una región constante que es diferente de la región constante de 11H10. En otras realizaciones de la invención, las regiones variables injertadas forman parte de un anticuerpo Fv de cadena sencilla.

En ciertas realizaciones, se pueden utilizar regiones constantes de especies distintas a la humana junto con la región o las regiones variables humanas para producir anticuerpos híbridos.

H. Anticuerpos completamente humanos

Se proporcionan métodos para producir anticuerpos completamente humanos específicos para un antígeno dado sin exponer a los seres humanos al antígeno ("anticuerpos completamente humanos"). Uno de los medios para implementar la producción de anticuerpos completamente humanos es la "humanización" del sistema inmunitario humoral del ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina humana (Ig) en ratones en los que se han inactivado genes de Ig endógenos es uno de los medios de producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos (Mab) en ratón, un animal que puede ser inmunizado con cualquier antígeno deseable. Mediante el uso de anticuerpos completamente humanos se pueden minimizar las respuestas inmunogénicas y alérgicas que a veces

pueden ser causadas por la administración de Mab de ratón o derivatizados de ratón a seres humanos como agentes terapéuticos.

Se pueden producir anticuerpos completamente humanos mediante la inmunización de animales transgénicos (generalmente ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Los antígenos para este fin tienen típicamente seis o más aminoácidos contiguos, y se conjugan opcionalmente con un portador, tal como un hapteno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555; Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362:255-258; y Bruggermann et al., 1993, *Year in Immunol.* 7:33. En un ejemplo de tal método, se producen animales transgénicos incapacitando los loci de inmunoglobulina de ratón endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera de ratón en el mismo, e insertando en el genoma de ratón grandes fragmentos de ADN del genoma humano que contienen loci que codifican las proteínas de las cadenas pesada y ligera humanas. Los animales parcialmente modificados, que tienen menos que el complemento completo de loci de inmunoglobulina humana, son cruzados a continuación para obtener un animal que tenga todas las modificaciones del sistema inmunitario deseadas. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos que son inmuno-específicos para el inmunógeno, pero tienen secuencias de aminoácidos humanas en lugar de murinas, incluyendo las regiones variables. Para más detalles de tales métodos, véase, por ejemplo, los documentos WO 96/33735 y WO 94/02602, que se incorporan a la presente como referencia. Los métodos adicionales relativos a los ratones transgénicos para producir anticuerpos humanos se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.545.807; 6.713.610; 6.673.986; 6.162.963; 5.545.807; 6.300.129; 6.255.458; 5.877.397; 5.874.299 y 5.545.806; en las publicaciones PCT WO91/10741, WO90/04036, y en los documentos EP 546073B1 y EP 546073A1.

Los ratones transgénicos descritos anteriormente, referidos en la presente memoria como "ratones HuMab", contienen un minilocus del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada humana (μ y γ) y ligera κ no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de la cadena μ y κ endógenos (Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de la IgM o κ de ratón en respuesta a la inmunización, y los transgenes de cadena pesada y ligera humanas introducidos experimentan cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ humanos de alta afinidad (Lonberg et al., más arriba; Lonberg y Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding y Lonberg, 1995, *Ann. NY Acad. Sci.* 764: 536-546). La preparación de ratones HuMab es descrita en detalle por Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Research*, 20: 6287-6295; Chen et al., 1993, *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al., 1994, *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* 113: 49-101; Taylor et al., 1994, *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg y Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding y Lonberg, 1995, *Ann. NY Acad. Sci.* 764: 536-546; Fishwild et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse adicionalmente las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; así como la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.545.807; las publicaciones internacionales números WO 93/1227; WO 92/22646; y WO 92/03918. Las tecnologías utilizadas para la producción de anticuerpos humanos en estos ratones transgénicos se describen también en el documento WO 98/24893, y Méndez et al., 1997, *Nature Genetics* 15: 146-156. Por ejemplo, se pueden utilizar las cepas de ratones transgénicos HCo7 y HCo12 para generar anticuerpos anti-Dkk-1 humanos.

Utilizando la tecnología de hibridomas, se pueden producir y seleccionados MAb humanos específicos de antígenos con la especificidad deseada a partir de los ratones transgénicos tales como los descritos anteriormente. Tales anticuerpos pueden clonarse y expresarse utilizando un vector y una célula anfitriona adecuados, o se pueden cosechar los anticuerpos a partir de células de hibridoma cultivadas.

Los anticuerpos completamente humanos también pueden obtenerse de genotecas de presentación en fagos (como describen Hoogenboom et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; y Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581). Las técnicas de presentación de fagos imitan la selección inmunitaria por medio de la presentación de repertorios de anticuerpos sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos, y la posterior selección de fagos por medio de su unión a un antígeno de elección. Una de tales técnicas se describe en la Publicación PCT Núm. WO 99/10494, que describe el aislamiento de alta afinidad y anticuerpos agonísticos funcionales para receptores MPL y msk utilizando tal enfoque.

I. Anticuerpos biespecíficos o bifuncionales

Los anticuerpos que se proporcionan también incluyen anticuerpos biespecíficos y bifuncionales que incluyen una o más CDR o una o más regiones variables como se ha descrito anteriormente. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional en algunos casos es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de métodos, incluyendo, pero no limitados a, fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véanse, p. ej., Songsivilai y Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.* 148: 1547-1553.

J. Otras formas diversas

Algunos de los anticuerpos o fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan son formas variantes de los anticuerpos y fragmentos descritos anteriormente (p. ej., los que tienen las secuencias enumeradas en las

Tablas 1-3). Por ejemplo, algunos de los anticuerpos o fragmentos son los que tienen una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en una o más de las cadenas pesada o ligera, regiones variables o CDR enumeradas en las Tablas 1-3.

Los aminoácidos de origen natural pueden dividirse en clases basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) ácidos: Asp, Glu;

4) alcalinos: His, Lys, Arg;

5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y

6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro miembro de la misma clase. Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden abarcar residuos de aminoácidos de origen no natural, que se incorporan típicamente mediante síntesis química de péptidos en lugar de mediante síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas de radicales de aminoácidos revertidas o invertidas.

Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de las clases anteriores por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del anticuerpo que son homólogas a los anticuerpos humanos, o en regiones no homólogas de la molécula.

Al realizar tales cambios, de acuerdo con ciertas realizaciones, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. El perfil hidropático de una proteína se calcula mediante la asignación a cada aminoácido de un valor numérico ("índice de hidropatía") y a continuación promediando repetitivamente estos valores a lo largo de la cadena peptídica. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobia y carga. Estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5), asparragina (-3,5), lisina (-3,9) y arginina (-4,5).

La importancia del perfil hidropático para conferir una función biológica interactiva a una proteína es comprendida en la técnica (véase, *por ejemplo*, Kyte et al., 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-131). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y todavía conservan una actividad biológica similar. Al realizar cambios basados en el índice hidropático, en ciertas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 . En algunos aspectos de la invención, se incluyen aquellos que están dentro de ± 1 , y en otros aspectos de la invención, se incluyen aquellos dentro de $\pm 0,5$.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar eficazmente basándose en la hidrofilia, concretamente cuando la proteína o péptido biológicamente funcionales creados de ese modo están destinados al uso en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso. En ciertas realizaciones, la mayor hidrofilia media local de una proteína, que se rige por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y unión al antígeno o inmunogenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1), serina (+0,3); asparragina (+0,2); glutamina (+0,2), glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al realizar cambios basados en valores de hidrofilia similares, en ciertas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están dentro de ± 2 , en otras realizaciones, se incluyen los que están dentro de ± 1 , y en otras realizaciones más, se incluyen aquellos dentro de $\pm 0,5$. En algunos casos, se puede, identificar también epítopos procedentes de secuencias de aminoácidos primarias basándose en la hidrofilia. Estas regiones son también conocidas como "regiones centrales epitópicas".

Las sustituciones de aminoácidos conservativas ilustrativas se exponen en la Tabla 4.

Tabla 4

Sustituciones de aminoácidos	
Residuos originales	Sustituciones ilustrativas
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Ásp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Ásp
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, Gln, Asn, ácido 1,4-diaminobutírico
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina

Un experto en la técnica será capaz de determinar las variantes de polipéptidos adecuadas como se expone en la presente memoria utilizando mecanismos bien conocidos. Un experto en la técnica puede identificar zonas adecuadas de la molécula que se pueden cambiar sin destruir la actividad eligiendo como blanco regiones que se cree que no son importantes para la actividad. El experto en la técnica también será capaz de identificar los residuos y porciones de las moléculas que están conservados entre polipéptidos similares. En realizaciones adicionales, incluso las zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden ser objeto de sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente la estructura del polipéptido.

Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar los estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. A la vista de tal comparación, se puede pronosticar la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a residuos de aminoácidos importantes para la actividad o estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para tales residuos de aminoácidos importantes pronosticados.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. A la vista de tal información, un experto en la técnica puede pronosticar el alineamiento de los residuos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. Un experto en la técnica puede elegir no realizar cambios radicales a los residuos de aminoácidos que se pronostica que están en la superficie de la proteína, ya que tales residuos pueden estar involucrados en importantes interacciones con otras moléculas. Por otra parte, un experto en la técnica puede generar variantes de ensayo que contienen una única sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Estas variantes

se pueden escrutar a continuación utilizando análisis para determinar la actividad neutralizadora de Dkk-1, (véanse los ejemplos de más abajo) proporcionando de ese modo información referente a cuales los aminoácidos se pueden cambiar y cuales no se deben cambiar. En otras palabras, basándose en la información recopilada a partir de tales experimentos rutinarios, un experto en la técnica puede determinar fácilmente las posiciones de aminoácidos en las que se deben evitar sustituciones adicionales ya sea solas o combinadas con otras mutaciones.

Numerosas publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véanse Moulton, 1996, *Curr. Op. in Biotech.* 7:422-427; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 13:222-245; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 113:211-222; Chou et al., 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148; Chou et al., 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; y Chou et al., 1979, *Biophys. J.* 26:367-384. Por otra parte, están disponibles en la actualidad programas informáticos para ayudar a la predicción de la estructura secundaria. Un método de predicción de la estructura secundaria se basa en el modelado de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia de más de 30%, o similitud mayor de 40% a menudo tienen topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de las bases de datos estructurales de proteínas (PDB) ha proporcionado una mejor previsibilidad de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de plegamientos en la estructura de un polipéptido o proteína. Véase Holm et al., 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247. Se ha sugerido (Brenner et al., 1997, *Curr. Op. Struct. Biol.* 7:369-376) que hay un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína dados y que una vez que se han resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural llegará a ser notablemente más precisa.

Los métodos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen el "enhebrado" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl et al., 1996, *Structure* 4:15-19), "Análisis del perfil" (Bowie et al., 1991, *Science* 253:164-170; Gribskov et al., 1990, *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov et al., 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355-4358), y "conexión evolutiva" (Véase Holm, 1999, más arriba, y Brenner, 1997, más arriba).

En algunas realizaciones de la invención, se realizan sustituciones de aminoácidos que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión de ligando o antígeno, y/o (4) confieren otras propiedades fisicoquímicas o funcionales a estos polipéptidos o las modifican. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de un solo o múltiples aminoácidos (en determinadas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia de origen natural. Las sustituciones se pueden realizar en aquella porción del anticuerpo que se encuentra fuera del dominio o los dominios formando contactos intermoleculares). En tales realizaciones, se pueden utilizar sustituciones de aminoácidos conservativas que no cambian sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (p. ej., remplazo de uno o más aminoácidos que no desorganizan la estructura secundaria que caracteriza el anticuerpo parental o nativo). Los ejemplos de las estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, ed.), 1984, W. H. Nueva York: Freeman and Company; *Introduction to Protein Structure* (Branden y Tooze, eds.), 1991, Nueva York: Garland Publishing; y Thornton et al, 1991, *Nature* 354: 105, que se incorporan a la presente memoria como referencia.

La invención también abarca variantes de glicosilación de los anticuerpos de la invención en las que se han alterado el número y/o tipo de sitios de glicosilación en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido original. En ciertas realizaciones, las variantes de proteínas de anticuerpos comprenden un número mayor o un menor de sitios de glicosilación ligado a N que el anticuerpo nativo. Un sitio de glicosilación ligado a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácidos para crear esta secuencia proporciona un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de carbohidrato ligada a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan o alteran esta secuencia evitarán la adición de una cadena de carbohidrato ligada a N presente en el polipéptido nativo. Por ejemplo, la glicosilación puede reducirse mediante la supresión de una Asn o mediante la sustitución de la Asn por un aminoácido diferente. En otras realizaciones, se crean uno o más sitios ligados a N nuevos. Los anticuerpos tienen típicamente un sitio de glicosilación ligado a N en la región Fc. Por ejemplo, el anticuerpo 11H10 descrito en la presente memoria tiene un sitio de glicosilación ligado a N en el aminoácido 315 (SEC ID NO: 12).

Las variantes de anticuerpos preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en donde uno o más residuos de cisteína en la secuencia de aminoácidos parental o nativa son suprimidos o sustituidos por otro aminoácido (p. ej. serina). Las variantes de cisteína son útiles, entre otros cuando los anticuerpos deben ser replegados a una conformación biológicamente activa. Las variantes de cisteína pueden tener menos residuos de cisteína que el anticuerpo nativo, y típicamente tienen un número par para minimizar las interacciones que resultan de las cisteínas desemparejadas.

Las cadenas pesadas y ligeras, los dominios de las regiones variables y las CDR que se han descrito se pueden utilizar para preparar polipéptidos que contienen una región de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un polipéptido Dkk-1. Por ejemplo, se pueden incorporar una o más de las CDR enumeradas en la Tabla 3 a una molécula (p. ej., un polipéptido) de forma covalente o no covalentemente para formar una inmunoadhesina. Una inmunoadhesina puede incorporar las CDR como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede conectar covalentemente las CDR a otra cadena polipeptídica, o puede incorporar las CDR de forma no covalente. Las CDR

permiten que la inmunoadhesina se una específicamente a un antígeno concreto de interés (p. ej., un polipéptido Dkk-1 o epítipo del mismo).

También se proporcionan derivados de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se describen en la presente memoria. El anticuerpo o fragmento derivatizados pueden comprender cualquier molécula o sustancia que confiera una propiedad deseada al anticuerpo o fragmento, tal como un aumento de la vida media en un uso concreto. El anticuerpo derivatizado puede comprender, por ejemplo, un radical detectable (o de marcaje) (p. ej., una molécula radiactiva, colorimétrica, antigénica o enzimática, una cuenta detectable (tal como una cuenta magnética o electrodensa (p. ej., oro)), o una molécula que se une a otra molécula (p. ej., biotina o estreptavidina)), un radical terapéutico o de diagnóstico (p. ej., un radical radiactivo, citotóxico, o farmacéuticamente activo), o una molécula que aumenta la idoneidad del anticuerpo para un uso concreto (p. ej., la administración a un sujeto, tal como un sujeto humano, u otros usos *in vivo* o *in vitro*). Los ejemplos de las moléculas que se pueden utilizar para derivar un anticuerpo incluyen albúmina (p. ej., albúmina de suero humano) y polietilenglicol (PEG). Se pueden preparar derivados unidos a albúmina y PEGilados de anticuerpos utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. En una realización, el anticuerpo se conjuga o se une de otra manera a transtiretina (TTR) o una variante de TTR. La TTR o la variante de TTR se pueden modificar químicamente, por ejemplo, con un agente químico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, poli (N-vinilpirrolidona), polietilenglicoles, homopolímeros de propilenglicol, co-polímeros óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados y poli(alcoholes vinílicos).

Otros derivados incluyen productos conjugados covalentes o de agregación de anticuerpos anti-Dkk-1, o fragmentos de los mismos, con otras proteínas o polipéptidos, por ejemplo mediante la expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados al extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido de anticuerpo anti-Dkk-1. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido señal heterólogo (o líder), p. ej., el líder del factor alfa de levadura, o un péptido tal como un epítipo tag. Las proteínas de fusión que contienen anticuerpo anti-Dkk-1 pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación del anticuerpo anti-Dkk-1 (p. ej., Poli-His). Un polipéptido de anticuerpo anti-Dkk-1 también puede estar conectado al péptido FLAG como describen Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988, y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.011.912. El péptido FLAG es altamente antigénico y proporciona un epítipo unido reversiblemente a un anticuerpo monoclonal (mAb) específico, permitiendo un análisis rápido y una fácil purificación de la proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para la preparación de proteínas de fusión en las que el péptido FLAG se fusiona a un polipéptido dado son asequibles comercialmente (Sigma, St. Louis, MO).

Los oligómeros que contienen uno o más polipéptidos de anticuerpo anti-Dkk-1 se pueden emplear como antagonistas de Dkk-1. Los oligómeros pueden estar en la forma de dímeros, trímeros, u oligómeros superiores unidos covalentemente o unidos no covalentemente. Se contempla el uso de oligómeros que comprenden dos o más polipéptidos de anticuerpos anti-Dkk-1, siendo un ejemplo un homodímero. Otros oligómeros incluyen heterodímeros, homotrímeros, heterotrímeros, homotetrámeros, heterotetrámeros, etcétera.

Una realización está dirigida a oligómeros que comprenden múltiples polipéptidos de anticuerpo anti-Dkk-1 ensamblados a través de interacciones covalentes o no covalentes entre radicales peptídicos fusionados a los polipéptidos de anticuerpos anti-Dkk-1. Tales péptidos pueden ser conectores peptídicos (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de promover la oligomerización. Las cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos se encuentran entre los péptidos que pueden promover la oligomerización de polipéptidos de anticuerpos anti-Dkk-1 anclados a los mismos, como se describe con más detalle a continuación.

En realizaciones concretas, los oligómeros pueden comprender de dos a cuatro polipéptidos de anticuerpos anti-Dkk-1. Los radicales de anticuerpos anti-Dkk-1 del oligómero pueden estar en cualquiera de las formas descritas anteriormente, p. ej., variantes o fragmentos. Preferiblemente, los oligómeros comprenden polipéptidos de anticuerpos anti-Dkk-1 que tienen actividad de unión a Dkk-1.

En una realización, se prepara un oligómero utilizando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluyendo el dominio Fc) ha sido descrita, p. ej., por Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; y Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, páginas 10.19.1 - 10/19/11.

Una realización de la presente invención está dirigida a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creadas fusionando de un fragmento de unión a Dkk-1 de un anticuerpo anti-Dkk-1 a la región Fc de un anticuerpo. El dímero se puede elaborar, por ejemplo, insertando una fusión génica que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, expresando la fusión génica en células anfitrionas transformadas con el vector de expresión recombinante, y permitiendo que la proteína de fusión expresada se ensamble en forma de moléculas de anticuerpo, después de lo cual se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre los radicales de Fc para proporcionar el dímero.

El término "polipéptido de Fc" según se utiliza en la presente memoria incluye las formas nativas y de muteína de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. También se incluyen las formas truncadas de tales polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden

radicales Fc (y los oligómeros formados a partir de los mismos) ofrecen la ventaja de una fácil purificación mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de Proteína A o Proteína G.

Un polipéptido de Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151 y en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.426.048 y 5.262.522 (cada una de las cuales se incorpora a la presente como referencia), es un polipéptido de cadena sencilla que se extiende desde la región bisagra N-terminal hasta el extremo C nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido de Fc útil es la muteína de Fc descrita en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.457.035 y en Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia de Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 ha sido cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 ha sido cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 ha sido cambiado de Gly a Ala. La muteína exhibe una afinidad reducida por los receptores Fc.

En otras realizaciones, la porción variable de las cadenas pesada y/o ligera de un anticuerpo anti-Dkk-1 tal como se describe en la presente memoria puede ser sustituida por la porción variable de una cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo.

Alternativamente, el oligómero es una proteína de fusión que comprende múltiples polipéptidos de anticuerpos anti-Dkk-1, con o sin conectores peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los conectores peptídicos adecuados se encuentran los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.751.180 y 4.935.233.

Otro método para la preparación de derivados de anticuerpos anti-Dkk-1 oligoméricos implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las cuales se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión al ADN (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), y desde entonces se han encontrado en una variedad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran los péptidos de origen natural y los derivados de los mismos que se dimerizan o trimerizan. Los ejemplos de los dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de la proteína D de tensioactivo pulmonar (SPD) descrita por Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191, incorporada a la presente como referencia. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a la misma es descrita por Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. En un enfoque, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un fragmento de anticuerpo anti-Dkk-1 o un derivado fusionado a un péptido de cremallera de leucina se expresan en células anfitrionas adecuadas, y los fragmentos de anticuerpos anti-Dkk-1 oligoméricos solubles o derivados que se forman se recuperan del sobrenadante de cultivo.

Algunos anticuerpos que se proporcionan tienen una afinidad de unión (K_a) para Dkk-1 de al menos 10^4 o 10^5 /M x segundo medida, por ejemplo, como se describe en los ejemplos de más abajo. Otros anticuerpos tienen una K_a de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 o 10^9 /M x segundo. Ciertos anticuerpos que se proporcionan tienen una baja velocidad de disociación. Algunos anticuerpos, por ejemplo, tienen una K_{off} $1 \times 10^{-4} s^{-1}$, $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ o inferior. En otra realización, la K_{off} es la misma que en un anticuerpo que tiene las siguientes combinaciones de dominios de la región variable VL1VH1, VL1VH2, VL1VH3, VL1VH4, VL1VH5, VL1VH6, VL1VH7, VL1VH8, VL1VH9, VL1VH10, VL2VH1, VL2VH2, VL2VH3, VL2VH4, VL2VH5, VL2VH6, VL2VH7, VL2VH8, VL2VH9, VL2VH10, VL3VH1, VL3VH2, VL3VH3, VL3VH4, VL3VH5, VL3VH6, VL3VH7, VL3VH8, VL3VH9, VL3VH10.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Dkk-1, que tiene una vida media de al menos un día *in vitro* o *in vivo* (p. ej. cuando se administra a un sujeto humano). En una realización, el anticuerpo tiene una vida media de al menos tres días. En otra realización, el anticuerpo o porción del mismo tiene una vida media de cuatro días o más. En otra realización, el anticuerpo o porción del mismo tiene una vida media de ocho días o más. En otra realización, el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo son derivatizados o modificados de tal manera que tienen una vida media más larga en comparación con el anticuerpo no derivatizado o no modificado. En otra realización, el anticuerpo contiene mutaciones puntuales para aumentar la vida media en suero, tal como se describe en el documento WO 00/09560, publicado el 24 de Febrero de 2000, incorporado como referencia.

IV. Ácidos nucleicos

También se proporcionan los ácidos nucleicos descritos anteriormente que codifican una o ambas cadenas de un anticuerpo de la invención, o un fragmento. Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble y pueden comprender nucleótidos de ARN y/o de ADN, y variantes artificiales de los mismos (p. ej., ácidos peptidonucleicos).

El ADN que codifica polipéptidos de anticuerpos (p. ej., cadena pesada o ligera, solamente dominio variable, o completo) se puede aislar de células B de ratones que han sido inmunizados con Dkk-1 o un fragmento inmunogénico del mismo. El ADN puede ser aislado mediante procedimientos convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La presentación en fagos es otro ejemplo de una técnica conocida por medio de la cual se pueden preparar derivados de anticuerpos. En un enfoque, los polipéptidos que son componentes de un anticuerpo de interés se expresan en cualquier sistema de expresión recombinante adecuado, y se permite que los polipéptidos expresados se ensamblen para formar moléculas de anticuerpo.

Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y las CDR de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan se enumeran en las Tablas 1-3 de más arriba. Debido a la degeneración del código genético, cada una de las secuencias de polipéptidos enumeradas en las Tablas 1-3 también está codificada por un gran número de otras secuencias de ácidos nucleicos, además de las enumeradas en las Tablas 1-3. La presente invención proporciona cada secuencia de nucleótidos degenerada que codifica cada anticuerpo de la invención.

Se pueden introducir cambios mediante mutación en un ácido nucleico, lo que conduce a cambios en la secuencia de aminoácidos del polipéptido (p. ej., un anticuerpo o derivado de anticuerpo de la invención) que codifica. Las mutaciones se pueden introducir utilizando cualquier mecanismo conocido en la técnica. En una realización, se cambian uno o más residuos de aminoácidos concretos utilizando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis dirigida al sitio. En otra realización, se cambian uno o más residuos seleccionados al azar utilizando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis al azar. No obstante, con independencia de cómo se elabore, un polipéptido mutante puede ser expresado y escrutado para determinar una propiedad deseada.

Se pueden introducir mutaciones en un ácido nucleico sin alterar significativamente la actividad biológica del polipéptido que codifica. Por ejemplo, se puede realizar sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos no esenciales.

En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o una porción del mismo (p. ej., un fragmento que contiene una o más CDR o uno o más dominios de la región variable). Los ejemplos de vectores incluyen, pero se limitan a, plásmidos, vectores virales, vectores de mamíferos no episómicos y vectores de expresión, por ejemplo, vectores de expresión recombinantes. Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula anfitriona. Los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células anfitrionas que se van a utilizar para la expresión, que están conectadas operablemente a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células anfitrionas (p. ej., el intensificador del gen temprano de SV40, el promotor del virus del sarcoma de Rous y promotor de citomegalovirus), aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células anfitrionas (p. ej., Secuencias reguladoras específicas de tejidos, véanse Voss et al., 1986, Trends Biochem Sci. 11:287, Maniatis y col., 1987, Science 236:1237, incorporadas como referencia en la presente memoria en su totalidad), y aquellas que dirigen la expresión inducible de una secuencia de nucleótidos en respuesta a un tratamiento o afección concretos (p. ej., el promotor de la metalotioneína en células de mamífero y el promotor sensible a tet y/o sensible a estreptomycin en sistemas tanto procarióticos como eucarióticos (véase *id.*). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula anfitriona que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células anfitrionas para producir de este modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona células anfitrionas en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Una célula anfitriona puede ser cualquier célula procariótica (p. ej., *E. coli*) o células eucariótica (p. ej., células de levadura, insecto, o mamífero (p. ej., células CHO)). El ADN vector se puede introducir en células procarióticas o eucarióticas a través de técnicas de transformación o transfección convencionales. Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizados, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (p. ej., para la resistencia a antibióticos) en las células anfitrionas junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección con fármacos (p. ej., las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán), entre otros métodos.

V. Preparación de Anticuerpos

Los anticuerpos no humanos que se proporcionan pueden derivar, por ejemplo, de cualquier animal productor de anticuerpos, tal como ratón, rata, conejo, cabra, burro, o primate no humano (tal como mono (p. ej., cynomolgus o mono rhesus) o simios (p. ej., chimpancé)). Se pueden utilizar anticuerpos no humanos, por ejemplo, en las aplicaciones basadas en el cultivo in vitro de células y en cultivos celulares, o cualquier otra aplicación en la que no se produzca o sea insignificante, se pueda prevenir, no sea una preocupación, o se desee una respuesta inmunitaria al anticuerpo. En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos se pueden producir mediante la inmunización con Dkk-1 completa o con la mitad carboxi-terminal de Dkk-1. Alternativamente, los anticuerpos no humanos mencionados se pueden originar mediante inmunización con los aminoácidos 221-236 y/o los aminoácidos 246 a 262 del SEC ID NO: 2, que son segmentos de Dkk-1 humana que forman parte del epítipo al cual se unen ciertos anticuerpos proporcionados en la presente memoria (p. ej., 11H10, véase la Figura 1). Los anticuerpos pueden ser

policlonales, monoclonales, o pueden ser sintetizados en células anfitrionas mediante la expresión de ADN recombinante.

Los anticuerpos completamente humanos se pueden preparar como se ha descrito anteriormente mediante la inmunización de animales transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana o mediante la selección de una genoteca de presentación en fagos que está expresando un repertorio de anticuerpos humanos.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) de la invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, incluyendo la metodología de anticuerpos monoclonales convencional, p. ej., la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256: 495. Alternativamente, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de linfocitos B. Un sistema animal adecuado para la preparación de hibridomas es el sistema murino, que es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos de inmunización y los mecanismos para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en la técnica. Para tales procedimientos, las células B de ratones inmunizados se fusionan con un compañero de fusión inmortalizado adecuado, tal como una línea celular de mieloma murino. Si se desea, se pueden inmunizar además ratas u otros mamíferos en lugar de ratones y se pueden fusionar células B procedentes de estos animales con la línea celular de mieloma murino para formar hibridomas. Alternativamente, se puede utilizar una línea celular de mieloma de una fuente que no sea de ratón. Los procedimientos de fusión para la elaboración de hibridomas también son bien conocidos.

Los anticuerpos de cadena sencilla que se proporcionan se pueden formar conectando fragmentos del dominio variable (región Fv) de la cadena pesada y ligera (véase, p. ej., la Tabla 2) a través de un puente de aminoácidos (conector peptídico corto), dando como resultado una única cadena polipeptídica. Tales Fv de cadena sencilla (scFv) se pueden preparar fusionando el ADN que codifica un conector peptídico entre los ADN que codifican los dos polipéptidos del dominio variable (V_L y V_H). Los polipéptidos resultantes se pueden volver a plegar sobre sí mismos para formar monómeros de unión al antígeno, o pueden formar multímeros (p. ej., dímeros, trímeros, o tetrameros), en función de la longitud de un conector flexible entre los dos dominios variables (Kortt et al., 1997, *Prot. Ing.* 10:423; Kortt et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108). Mediante la combinación de diferentes polipéptidos que comprenden V_L y V_H , se puede formar scFv multiméricos que se unen a diferentes epítopos (Kriangkum et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla incluyen las descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.946.778; Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879; Ward et al., 1989, *Nature* 334:544, de Graaf et al., 2002, *Methods Mol Biol.* 178:379-87. Los anticuerpos de cadena sencilla derivados de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a los scFv que comprenden las combinaciones de dominios variables: VL1VH1, VL1VH2, VL1VH3, VL1VH4, VL1VH5, VL1VH6, VL1VH7, VL1VH8, VL1VH9, VL1VH10, VL2VH1, VL2VH2, VL2VH3, VL2VH4, VL2VH5, VL2VH6, VL2VH7, VL2VH8, VL2VH9, VL2VH10, VL3VH1, VL3VH2, VL3VH3, VL3VH4, VL3VH5, VL3VH6, VL3VH7, VL3VH8, VL3VH9, VL3VH10.

Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria que son de una subclase se pueden cambiar a anticuerpos de una subclase diferente utilizando métodos de cambio de subclase. De este modo, los anticuerpos IgG pueden derivar de un anticuerpo IgM, por ejemplo, y *viceversa*. Tales técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades de unión a antígenos de un anticuerpo dado (el anticuerpo parental), pero también exhiben propiedades biológicas asociadas a un isotipo o subclase de anticuerpo diferentes de los del anticuerpo parental. Se pueden emplear técnicas de ADN recombinante. El ADN clonado que codifica polipéptidos de anticuerpo concretos se puede emplear en tales procedimientos, p. ej., el ADN que codifica el dominio constante de un anticuerpo del isotipo deseado. Véase, p. ej., Lantto et al., 2002, *Methods Mol. Biol.* 178:303-16.

Por consiguiente, los anticuerpos que se proporcionan incluyen los que comprenden, por ejemplo, las siguientes combinaciones de dominios variables: VL1VH1, VL1VH2, VL1VH3, VL1VH4, VL1VH5, VL1VH6, VL1VH7, VL1VH8, VL1VH9, VL1VH10, VL2VH1, VL2VH2, VL2VH3, VL2VH4, VL2VH5, VL2VH6, VL2VH7, VL2VH8, VL2VH9, VL2VH10, VL3VH1, VL3VH2, VL3VH3, VL3VH4, VL3VH5, VL3VH6, VL3VH7, VL3VH8, VL3VH9, VL3VH10 que tiene un isotipo deseado (p. ej., IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE, e IgD), así como fragmentos Fab o F(ab')₂ de los mismos. Por otra parte, si se desea una IgG4, también puede ser deseable introducir una mutación puntual (CPSCP → CPPCP) en la región de bisagra como describen Bloom et al., 1997, *Protein Science* 6:407, que se incorpora a la presente memoria como referencia) para aliviar una tendencia a formar enlaces disulfuro entre las cadenas H que puede conducir a la heterogeneidad de los anticuerpos IgG4.

Por otra parte, también se conocen técnicas para obtener anticuerpos que tienen diferentes propiedades (esto es, afinidades variables para el antígeno al que se unen). Una de estas técnicas, conocida como barajado de cadenas, implica desplegar repertorios de genes de dominios variables de inmunoglobulina sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos, a menudo referida como presentación en fagos. El barajado de cadenas se ha utilizado para preparar anticuerpos de alta afinidad para el hapteno 2-feniloxazol-5-ona, como describen Marks et al., 1992, *Biotechnology*, 10:779.

Se pueden realizar modificaciones conservativas en las cadenas pesadas y ligeras descritas en la Tabla 1 (y las modificaciones correspondientes de los ácidos nucleicos que codifican) para producir un anticuerpo anti-Dkk-1 que

tiene características funcionales y bioquímicas. Los métodos para lograr tales modificaciones se han descrito anteriormente.

Los anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos de acuerdo con la invención se pueden modificar adicionalmente de diversas maneras. Por ejemplo, si se van a utilizar para fines terapéuticos, se pueden conjugar con polietilenglicol (pegilación) para prolongar la vida media en suero o para mejorar la liberación de proteínas. Alternativamente, la región V de los anticuerpos sujeto o fragmentos de los mismos se pueden fusionar con la región Fc de una molécula de anticuerpo diferente. La región Fc utilizada para este propósito se puede modificar de modo que no se una al complemento, reduciendo así la probabilidad de inducir la lisis de las células en el paciente cuando se utiliza la proteína de fusión como agente terapéutico. Además, los anticuerpos sujeto o fragmentos funcionales de los mismos se pueden conjugar con albúmina de suero humano para mejorar la vida media en suero del anticuerpo o fragmento del mismo. Otro compañero de fusión útil para los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos es la transtiretina (TTR). La TTR tiene la capacidad de formar un tetrámero, de este modo una proteína de fusión de anticuerpo-TTR puede formar un anticuerpo multivalente que puede aumentar su avidéz de unión.

Alternativamente, se pueden lograr modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o bioquímicas de los anticuerpos y fragmentos descritos en la presente memoria mediante la creación de sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena molecular principal en la zona de la sustitución, por ejemplo, en forma de una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la voluminosidad de la cadena lateral. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo por un residuo no nativo que tiene poco o ningún efecto sobre la polaridad o la carga del residuo de aminoácido en esa posición. Por otra parte, también se puede sustituir cualquier residuo nativo en el polipéptido por alanina, como se ha descrito previamente para la mutagénesis de barrido con alanina.

Las sustituciones de aminoácidos (ya sea conservativas o no conservativas) de los anticuerpos sujeto pueden ser implementadas por los expertos en la técnica mediante la aplicación de mecanismos rutinarios. Las sustituciones de aminoácidos se pueden utilizar para identificar residuos importantes de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria, o para aumentar o disminuir la afinidad de estos anticuerpos por la Dkk-1 humana o para modificar la afinidad de unión de otros anticuerpos anti-Dkk-1 descritos en la presente memoria.

VI. Expresión de anticuerpos anti-Dkk-1

Los anticuerpos anti-Dkk-1 y los fragmentos funcionales inmunológicos se pueden preparar mediante cualquiera de diversas técnicas convencionales. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos anti-Dkk-1 mediante sistemas de expresión recombinante, utilizando cualquier mecanismo conocido en la técnica. Véanse, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis*, Kennet et al. (Eds.) Plenum Press, Nueva York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden expresar en líneas celulares de hibridoma o en líneas celulares distintas de hibridomas. Los constructos de expresión que codifican los anticuerpos se pueden usar para transformar una célula anfitriona de mamífero, insecto o microbiana. La transformación puede realizarse usando cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula anfitriona, incluyendo, por ejemplo el empaquetamiento del polinucleótido en un virus o un bacteriófago y la transducción de una célula anfitriona con el constructo por medio de procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ilustra mediante las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, y 4.959.455 (cuyas patentes se incorporan a la presente como referencia para cualquier propósito). El procedimiento de transformación óptimo utilizado dependerá de qué tipo de célula anfitriona está siendo transformado. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en el liposoma, mezclado de ácido nucleico con lípidos cargados positivamente, y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Los constructos de expresión recombinantes de la invención comprenden típicamente una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende uno o más de los siguientes: una región constante de la cadena pesada (p. ej., C_H1 , C_H2 y/o C_H3) una región variable de la cadena pesada, una región constante de la cadena ligera, una región variable de la cadena ligera, una o más CDR de la cadena pesada o ligera del anticuerpo anti-Dkk-1. Estas secuencias de ácidos nucleicos se insertan en un vector de expresión apropiado utilizando técnicas de ligación convencionales. En una realización, la región constante de la cadena pesada o ligera de 11H10 se añade al extremo C de la región variable de la cadena pesada o ligera específica de Dkk-1 y se liga en un vector de expresión. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula anfitriona concreta empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula anfitriona, lo que permite que se pueda producir la amplificación y/o expresión del gen). En algunas realizaciones, se utilizan vectores que emplean análisis de complementación de fragmentos de proteínas utilizando informadores proteicos, tales como dihidrofolato reductasa (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.270.964, que se incorpora a la presente como referencia). Los vectores de expresión adecuados se pueden adquirir, por ejemplo, de Invitrogen Life Technologies o

BD Biosciences (antes "Clontech"). Otros vectores útiles para la clonación y expresión de los anticuerpos y fragmentos de la invención incluyen los descritos por Bianchi y McGrew, *Biotech Biotechnol Bioeng* 84 (4): 439-44 (2003), que se incorpora a la presente por referencia. Los vectores de expresión adecuados adicionales se comentan, por ejemplo, en *Methods Enzymol*, vol. 185 (DV Goeddel, ed.), 1990, Nueva York: Academic Press, que se incorpora a la presente como referencia.

Típicamente, los vectores de expresión utilizados en cualquiera de las células anfitrionas contienen secuencias para el mantenimiento de plásmido o virus y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Tales secuencias, denominadas colectivamente como "secuencias flanqueantes" incluyen típicamente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos conectadas operativamente: un promotor, una o más secuencias intensificadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio donador y aceptor de empalme, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción de polipéptidos, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región poliligadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar, y un elemento marcador seleccionable.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia codificante "etiqueta", es decir, una molécula de oligonucleótido situada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante, una secuencia de oligonucleótidos que codifica poliHis (tal como hexahis), u otra "etiqueta" para la cual existen anticuerpos asequibles comercialmente, tales como FLAG[®], HA (hemaglutinina del virus de influenza), o myc. La etiqueta se fusiona típicamente a la proteína de anticuerpo después de la expresión, y puede servir como un medio para purificación por afinidad del anticuerpo a partir de la célula anfitriona. La purificación por afinidad puede lograr, por ejemplo, mediante cromatografía en columna utilizando anticuerpos contra la etiqueta como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede eliminarse posteriormente del polipéptido de anticuerpo purificado mediante diversos medios tales como el uso de ciertas peptidasas para la escisión.

Las secuencias flanqueantes en el vector de expresión puede ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula anfitriona), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula anfitriona), (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintéticas o nativas. Como tal, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procariótico o eucariótico, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional en, y pueda ser activada por, la maquinaria de la célula anfitriona.

Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención se pueden obtener por medio de cualquiera de diversos métodos bien conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias flanqueantes útiles en la presente memoria habrán sido identificadas previamente mediante mapeo y/o mediante digestión con endonucleasas de restricción y de ese modo pueden ser aisladas de la fuente tisular apropiada utilizando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante puede ser conocida. Aquí, la secuencia flanqueante se puede sintetizar usando los métodos descritos en la presente memoria para la síntesis de ácidos o clonación nucleicos.

Cuando es conocida la totalidad o sólo una porción de la secuencia flanqueante, ésta se puede obtener utilizando la PCR y/o escrutando una biblioteca genómica con un oligonucleótido adecuado y/o un fragmento de secuencia flanqueante de la misma o de otra especie. Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, se puede aislar un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante de una pieza más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen u otros genes. El aislamiento se puede completar mediante digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado seguido de aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen[®] (Chatsworth, CA), u otros métodos conocidos por el experto en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para lograr este propósito será fácilmente evidente para los expertos en la técnica.

Un origen de replicación es típicamente una parte de los vectores de expresión procariotas, particularmente los adquiridos comercialmente, y el origen ayuda a la amplificación del vector en una célula anfitriona. Si el vector de elección no contiene un origen del sitio de replicación, se puede sintetizar uno químicamente basándose en una secuencia conocida, y ligar en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas y son útiles diversos orígenes (p. ej., SV40, poliovirus, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV), o papilomavirus tales como HPV o BPV) para vectores de clonación en células de mamíferos. Generalmente, no se necesita un origen de replicación de mamífero para los vectores de expresión en mamíferos (p. ej., el origen de SV40 es utilizado a menudo sólo porque contiene el promotor temprano).

Los vectores de expresión y clonación de la presente invención contendrán típicamente un promotor que es reconocido por el organismo anfitrión y está conectado operablemente a un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo. Los promotores son secuencias no transcritas situadas aguas arriba (es decir, 5') con respecto al codón de inicio de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores

inducibles inician el aumento de los niveles de transcripción de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitutivos, por otra parte, inician la producción continua del producto génico; esto es, existe poco o ningún control experimental sobre la expresión génica. Se conoce un gran número de promotores, reconocidos por una variedad de células anfitrionas potenciales. Un promotor adecuado está conectado operablemente al ADN que codifica el anticuerpo anti-Dkk-1 mediante la eliminación del promotor del ARN de origen mediante digestión con enzimas de restricción o amplificando el promotor por medio de la reacción en cadena de la polimerasa e insertando la secuencia promotora deseada en el vector.

Los promotores adecuados para su uso con anfitriones de levadura también son bien conocidos en la técnica. Los intensificadores de levadura se utilizan ventajosamente con promotores de levadura. Los promotores adecuados para su uso con células anfitrionas de mamífero son bien conocidos e incluyen, pero no se limitan a, los obtenidos de genomas de virus tales como el virus del polio, el virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferiblemente virus de simio 40 (SV40). Otros promotores de mamíferos adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de la actina.

Los promotores concretos útiles en la práctica de los vectores de expresión recombinantes de la invención incluyen, pero no se limitan a: la región del promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, *Nature* 290: 304-10); el promotor de CMV; el promotor contenido en la repetición terminal 3' larga del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, et al, 1980, *Cell*, 22: 787-97); el promotor de la timidina quinasa de herpes (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Ciencia. U.S.A.* 78: 1444-1445); las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al, 1982, *Nature* 296: 39-42); vectores de expresión procarióticos tales como el promotor de la beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 3727-31); o el promotor tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 21-25). También se encuentran disponibles para su uso las siguientes regiones de control transcripcional animales, que presentan especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al, 1984, *Cell* 38: 639-46; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7: 425-515); La región de control del gen de la insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-22); la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al, 1986, *Cell* 45: 485-95); la región de control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, *Genes y Devel.* 1: 268-76); la región de control del gen de alfa-feto-proteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639-1648; Hammer et al, 1987, *Science* 235: 53-58); la región de control del gen de la alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1: 161-71); la región de control del gen de la beta-globina que es activa en células mieloides (Mogam et al, 1985, *Nature* 315: 338-40; Kollias et al, 1986, *Cell* 46: 89-94); la región de control del gen de la proteína básica de la mielina que es activa en células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead et al, 1987, *Cell*, 48: 703-12); la región de control del gen de la cadena-2 ligera de la miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-86); la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que es activa en el hipotálamo (Mason et al, 1986, *Science* 234: 1372-78); y muy concretamente la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al, 1984, *Cell*, 38: 647-58; Adames et al, 1985, *Nature* 318: 533-38; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 1436-1444).

Se puede insertar una secuencia intensificadora en el vector para aumentar la transcripción en eucariotas superiores de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo de la presente invención. Los intensificadores son elementos de ADN que actúan en cis, generalmente de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan sobre los promotores para aumentar la transcripción. Los intensificadores son relativamente independientes de la orientación y la posición. Se han encontrado 5' y 3' con respecto a la unidad de transcripción. Se conocen numerosas secuencias intensificadoras disponibles de genes de mamífero (p. ej., globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). También se puede utilizar una secuencia intensificadora de un virus. El intensificador de SV40, el intensificador del promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador del polio, y los intensificadores de adenovirus son elementos intensificadores ilustrativos para la activación de promotores eucarióticos. Si bien un intensificador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a una molécula de ácido nucleico, éste se coloca típicamente en un sitio 5' con respecto al promotor.

En los vectores de expresión, una secuencia de terminación de la transcripción se localiza típicamente 3' del extremo de una región codificante del polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Una secuencia de terminación de la transcripción utilizada para la expresión en células procarióticas es típicamente un fragmento rico en GC seguido de una secuencia poli-T. Si bien la secuencia es clonada fácilmente a partir de una genoteca o incluso adquirida comercialmente como parte de un vector, también se puede sintetizar fácilmente utilizando métodos para la síntesis de ácido nucleico tales como los descritos en la presente memoria.

Un elemento de un gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula anfitriona desarrollada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos utilizados en los vectores de expresión que codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células anfitrionas procarióticas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios

complejos. Los ejemplos de los marcadores seleccionables incluyen el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a la tetraciclina. También se puede utilizar un gen de resistencia a neomicina bacteriano para la selección tanto en células anfitrionas procarióticas como eucarióticas.

Se pueden utilizar otros genes de selección para amplificar el gen que será expresado. La amplificación es un proceso por medio del cual los genes que no pueden ser expresados en una única copia a niveles suficientemente elevados como para permitir la supervivencia y el crecimiento de las células en condiciones de selección determinadas se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de los marcadores seleccionables amplificables adecuados para las células de mamífero incluyen la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la timidina quinasa sin promotor. En el uso de estos marcadores los transformantes de células de mamífero se colocan bajo presión de selección en donde solo los transformantes están adaptados excepcionalmente para sobrevivir en virtud del gen de selección presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se incrementa sucesivamente, permitiendo de esta manera la supervivencia de solamente aquellas células en las que se ha amplificado el gen de selección. Bajo estas circunstancias, el ADN adyacente al gen de selección, tal como el ADN que codifica un anticuerpo de la invención, es co-amplificado con el gen de selección. Como resultado, se sintetizan cantidades crecientes de un polipéptido anti-Dkk-1 a partir del ADN amplificado.

Normalmente es necesario un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento está situado típicamente 3' con respecto al promotor y 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido que se va a expresar.

En algunos casos, por ejemplo cuando se desea la glicosilación en un sistema de expresión de una célula anfitriona eucariótica, se pueden manipular diversas presecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de peptidasa de un péptido señal concreto, o añadir pro-secuencias, que también pueden afectar a la glicosilación. El producto proteico final puede tener, en la posición -1 (con respecto al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales que inciden en la expresión, que pueden no haber sido totalmente eliminado. Por ejemplo, el producto proteico final puede tener uno o dos residuos de aminoácidos encontrados en el sitio de escisión de la peptidasa, anclados al extremo amino. Alternativamente, el uso de algunos sitios de escisión de enzimas puede dar como resultado una forma ligeramente truncada todavía activa del polipéptido deseado, si la enzima corta en dicha zona dentro del polipéptido maduro.

Cuando un vector de expresión disponible en el mercado carece de algunas de las secuencias flanqueantes deseadas como descritas anteriormente, el vector puede ser modificado ligando individualmente estas secuencias en el vector. Después de haber seleccionado y modificado el vector según se desee, se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo en el sitio apropiado del vector.

El vector completado que contiene secuencias que codifican el anticuerpo de la invención o el fragmento inmunológicamente funcional del mismo se inserta en una célula anfitriona adecuada para la amplificación y/o expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo en una célula anfitriona seleccionada puede lograrse mediante métodos bien conocidos que incluyen métodos tales como transfección, infección, cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, método de DEAE-dextrano, u otras técnicas conocidas. El método seleccionado estará en parte en función del tipo de célula anfitriona que se vaya a utilizar. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por el experto en la técnica.

La célula anfitriona transformada, cuando se cultiva bajo condiciones apropiadas, sintetiza un anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento funcional del mismo que se puede recoger con posterioridad del medio de cultivo (si la célula anfitriona lo secreta al medio) o directamente de la célula anfitriona que lo produce (si no es secretado). La selección de una célula anfitriona apropiada dependerá de diversos factores, tales como los niveles de expresión deseados, las modificaciones polipeptídicas que son deseables o necesarias para la actividad (tales como la glicosilación o la fosforilación) y la facilidad de plegado en una molécula biológicamente activa.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como anfitriones para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC), tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células renales de cría hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), y un otras diversas líneas celulares. En ciertas realizaciones, la mejor línea celular para expresar un constructo de ADN concreto se puede seleccionar sometiendo a ensayo diferentes líneas celulares para determinar cuáles tienen los niveles más altos de los niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión a Dkk-1 constitutivas.

VI. Composiciones farmacéuticas

A. Ejemplos de formulaciones

En ciertas realizaciones, la invención también proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos anti-Dkk-1 sujeto o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos junto con uno o más de los siguientes: un diluyente farmacéuticamente aceptable; un portador; un solubilizante; un emulsionante; un conservante; y/o un coadyuvante. Tales composiciones pueden contener una cantidad eficaz del anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo. De este modo, también se incluye el uso de anticuerpos y fragmentos inmunológicamente activos que se proporcionan en la presente memoria en la preparación de una composición farmacéutica o medicamento. Tales composiciones se pueden utilizar en el tratamiento de una variedad de enfermedades tales como las enumeradas a continuación en la sección de utilidades ilustrativas.

Los componentes de formulación aceptables para las preparaciones farmacéuticas son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas. Además de los anticuerpos y de los fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan, las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener componentes para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. Los materiales adecuados para la formulación de las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina); antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como acetato, borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos), agentes volumétricos (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminetetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcares (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes para mejorar la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes mejoradores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de liberación; diluyentes; excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticos. (Véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, (AR Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company), incorporada a la presente como referencia.

El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica pueden ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Los vehículos o portadores adecuados para tales composiciones incluyen agua para inyectables, solución salina fisiológica o fluido cerebroespinal artificial, posiblemente con un suplemento de otros materiales comunes en composiciones para la administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos ilustrativos adicionales. Las composiciones que comprenden anticuerpos anti-Dkk-1 o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos se pueden preparar para su almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Adicionalmente, los anticuerpos anti-Dkk-1 o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos se pueden formular en forma de productos liofilizados utilizando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Los componentes de la formulación están presentes a concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Los tampones se usan ventajosamente para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,5, o alternativamente, entre aproximadamente 5,0 y 8,0. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender tampón TRIS de aproximadamente pH 6,5 a 8,5, o tampón de acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que puede incluir adicionalmente sorbitol o un sustituto adecuado del mismo.

Una composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de anticuerpos anti-Dkk-1 o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos mezclados con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, las disoluciones se pueden preparar en una forma de dosificación unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, materiales inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco.

Las composiciones farmacéuticas adicionales están en la forma de formulaciones de liberación sostenida o controlada. Se pueden utilizar técnicas para formular una variedad de otros medios de liberación sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o cuentas porosas e inyecciones de depósito (véase, por ejemplo, el documento PCT/US93/00829, que describe la administración controlada de micropartículas poliméricas porosas para la liberación de composiciones farmacéuticas). Las preparaciones de

administración sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas, poliésteres, hidrogeles, polilactidas (Patente de los Estados Unidos Núm. 3.773.919 y Patente Europea EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al, 1983, *Biopolymers* 22: 547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer et al, 1981, *J Biomed Mater Res* 15: 167-277) y Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12: 98-105), etileno-acetato de vinilo (Langer et al., *ídem.*) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Patente Europea EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que se pueden preparar mediante cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica. Véanse p. ej., Eppstein et al, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-3692; Patente Europea EP 036.676; Patente Europea EP 088.046 y Patente Europea EP 143.949.

La composición farmacéutica que se va a utilizar para la administración *in vivo* es típicamente estéril. La esterilización puede conseguirse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Si la composición está liofilizada, la esterilización puede llevarse a cabo ya sea antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una disolución. En ciertas realizaciones, las composiciones parenterales se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa para solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por medio de una aguja de inyección hipodérmica, o una jeringa precargada estéril lista para usar para la inyección.

Una vez que la composición farmacéutica de la invención ha sido formulada, ésta se puede almacenar en viales estériles en forma de disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o en forma de un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones se pueden almacenar ya sea en una forma lista para su uso o en una forma (p. ej., liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

Los componentes utilizados para formular las composiciones farmacéuticas son preferiblemente de gran pureza y están sustancialmente libres de contaminantes potencialmente nocivos (p. ej., al menos de grado alimentario (NF), generalmente al menos de grado analítico, y más típicamente al menos de grado farmacéutico). Por otra parte, las composiciones destinadas al uso *in vivo* son habitualmente estériles. En la medida en que un compuesto dado debe ser sintetizado antes de su uso, el producto resultante está típicamente sustancialmente libre de cualquier agente potencialmente tóxico, particularmente cualquier endotoxina, que pueda estar presente durante el proceso de síntesis o purificación. Las composiciones para la administración parenteral son también estériles, sustancialmente isotónicas y elaboradas en condiciones GMP.

La presente invención proporciona kits para la producción de unidades de administración de múltiples dosis o de una sola dosis. Por ejemplo, los kits de acuerdo con la invención pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca y un segundo recipiente que tiene un diluyente acuoso, incluyendo por ejemplo jeringas precargadas de una sola y múltiples cámaras (p. ej., jeringas de líquido, liojeringas o jeringas sin aguja).

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden liberar por vía parenteral, típicamente mediante inyección. Las inyecciones pueden ser intraoculares, intraperitoneales, intraportales, intramusculares, intravenosas, intratecales, intracerebrales (intraparenquimales), intracerebroventriculares, intraarteriales, intralesionales, perilesionales o subcutáneas. Se pueden utilizar gotas oculares para la administración intraocular. En algunos casos, las inyecciones se pueden localizar en las proximidades de uno hueso o varios huesos concretos a los que se dirige el tratamiento. Para la administración parenteral, los anticuerpos se pueden administrar en una disolución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos que comprende los anticuerpos anti-Dkk-1 deseados o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es el agua destilada estéril en la que se formulan los anticuerpos anti-Dkk-1 o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos en forma de una disolución isotónica, estéril, apropiadamente conservada.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-Dkk-1 sujeto y los fragmentos funcionales de los mismos se pueden administrar mediante inyección en embolada o mediante infusión continua, mediante dispositivos de implantación, sistemas de liberación sostenida u otros medios para lograr una liberación prolongada. La composición farmacéutica también se puede administrar localmente a través de implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el cual se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se utiliza un dispositivo de implantación, el dispositivo puede ser implantado en cualquier tejido u órgano adecuado, y la liberación de la molécula deseada puede ser mediante difusión, embolada de liberación temporizada, o de liberación continua. La preparación se puede formular con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, o ácido copoli(láctico/glicólico) (PLGA), cuentas o liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o sostenida del producto que puede ser administrado a continuación a través de una inyección de depósito. La formulación con ácido hialurónico tiene el efecto de promover la duración sostenida en la circulación.

Las composiciones sujeto que comprenden un anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento funcional del mismo se pueden formular para su inhalación. En estas realizaciones, se formula un anti-anticuerpo Dkk-1 en forma de un polvo seco para su inhalación, o también se pueden formular disoluciones de inhalación de anticuerpo anti-Dkk-1 con un propelente para la administración en aerosol, por ejemplo mediante nebulización. Adicionalmente se describe la

administración pulmonar en el documento PGT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente, y que se incorpora a la presente como referencia.

Ciertas composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas a través del tracto digestivo, por ejemplo por vía oral. Los anticuerpos anti-Dkk-1 sujeto o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos que se administran de esta manera se pueden formular con o sin los portadores utilizados habitualmente en la composición de las formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Se puede diseñar una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación pre-sistémica. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción del anticuerpo anti-Dkk-1 o fragmento funcional del mismo. Para la administración oral, se pueden utilizar aminoácidos modificados para conferir resistencia a las enzimas digestivas. También se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos, y aglutinantes.

Las composiciones sujeto que comprenden los anticuerpos anti-Dkk-1 o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos también se pueden usar *ex vivo*. En tales casos, células, tejidos u órganos que han sido retirados del paciente son expuestos a o se cultivan con el anticuerpo anti-Dkk-1. Las células cultivadas se pueden volver a implantar a continuación en el paciente o en un paciente diferente o se pueden utilizar para otros fines.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-Dkk-1 o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos se pueden administrar implantando ciertas células que se han modificado genéticamente, usando métodos tales como los descritos en la presente memoria, para expresar y secretar el polipéptido. Tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas, o xenogénicas, o pueden ser inmortalizadas. Con el fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden ser encapsuladas para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente recintos o membranas poliméricos semipermeables, biocompatibles que permiten la liberación del producto o los productos proteicos pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

B. Dosis

Las composiciones farmacéuticas que se proporcionan pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. Una "cantidad eficaz" hace referencia generalmente a una cantidad que es una cantidad suficiente, pero no tóxica, de ingrediente activo (es decir, un anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo) para lograr el efecto deseado, que es una reducción o eliminación de la gravedad y/o frecuencia de los síntomas y/o una mejora o remedio del daño. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad que es suficiente para remediar un estado de enfermedad o sus síntomas, o prevenir, impedir, retrasar o revertir de otro modo el progreso de una enfermedad o cualquier otro síntoma no deseable. Una "cantidad profilácticamente eficaz" hace referencia a una cantidad que es eficaz para prevenir, impedir o retardar la aparición de un estado de enfermedad o sus síntomas.

En general, la toxicidad y la eficacia terapéutica del anticuerpo o fragmento se pueden determinar de acuerdo con procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares y/o animales experimentales, incluyendo, por ejemplo, la determinación de la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la razón DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren las composiciones que exhiben índices terapéuticos grandes.

Los datos obtenidos a partir de los estudios de cultivo celulares y/o en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificaciones para los seres humanos. La dosificación del ingrediente activo se encuentra típicamente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada.

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende anticuerpos anti-Dkk-1 o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos que se va a emplear terapéuticamente o profilácticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y de los objetivos terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento, de acuerdo con determinadas realizaciones, variará de ese modo dependiendo, en parte, de la molécula liberada, la indicación para la que se esté utilizando el anticuerpo anti-Dkk-1, la ruta de administración, y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o el estado (la edad y salud general) del paciente. Un médico clínico puede valorar la dosificación y modificar la ruta de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Las dosificaciones típicas oscilan desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En ciertas realizaciones, la dosificación puede oscilar de 0,1 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg; o de 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o de 5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo anti-Dkk-1 o el fragmento inmunológicamente funcional del mismo en la formulación. Por ejemplo, un médico clínico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que consiga el efecto deseado. La composición se puede administrar por lo tanto como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua mediante un dispositivo de implantación o un catéter. El tratamiento puede ser continuo o intermitente a lo largo del tiempo. La mejora adicional de la dosificación apropiada es realizada de forma rutinaria por los expertos normales en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas realizadas rutinariamente por los mismos. Las dosificaciones apropiadas se pueden lograr mediante el uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

Para tratar un trastorno médico caracterizado por una expresión anormal o exceso de Dkk-1, se puede administrar al paciente una composición que comprende los anticuerpos anti-Dkk-1 sujeto o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora sostenida en al menos un indicador que refleje la gravedad del trastorno. Una mejora se considera "sostenida" si el paciente presenta la mejoría en al menos dos ocasiones separadas por al menos uno a siete días, o en algunos casos una a seis semanas. El intervalo apropiado dependerá en cierta medida de qué afección se esté tratando; está dentro del alcance del médico experto determinar el intervalo apropiado para determinar si la mejora es sostenida. El grado de mejora se determina basándose en signos o síntomas, y también se pueden emplear cuestionarios que están dirigidos al paciente, tales como cuestionarios de calidad de vida.

Los diferentes indicadores que reflejan el grado de la enfermedad del paciente se pueden evaluar para determinar si la cantidad y el tiempo del tratamiento son suficientes. El valor en el período inicial para el indicador o los indicadores seleccionados se establece mediante el examen del paciente antes de la administración de la primera dosis de anticuerpo. Preferiblemente, el examen en el período inicial se realiza dentro de aproximadamente 60 días de la administración de la primera dosis. Si el anticuerpo se está administrando para tratar síntomas agudos, tal como por ejemplo, para tratar un hueso roto, la primera dosis se administra tan pronto como sea posible prácticamente después de que se haya producido la lesión.

La mejora se induce mediante la administración de los anticuerpos anti-Dkk-1 sujeto o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos hasta que el paciente manifiesta una mejora sobre el período inicial para el indicador o los indicadores escogidos. En el tratamiento de las afecciones crónicas, este grado de mejora se obtiene mediante la administración repetida de este medicamento durante un período de al menos un mes o más, p. ej., durante uno, dos, o tres meses o más, o indefinidamente. A menudo es suficiente un período de una a seis semanas, o incluso una sola dosis, para el tratamiento de las condiciones agudas. Para las lesiones o afecciones agudas, puede ser suficiente una sola dosis.

Aunque el grado de la enfermedad del paciente después del tratamiento puede parecer mejorado de acuerdo con uno o más indicadores, el tratamiento debe continuar indefinidamente al mismo nivel o a una dosis o frecuencia reducidas. Una vez que el tratamiento se ha reducido o interrumpido, se puede reanudar más tarde al nivel original si reaparecieran los síntomas.

VII. Utilidades ilustrativas para los anticuerpos anti-Dkk-1

A. Detección y Escrutinio

Los anticuerpos anti-Dkk-1 sujeto y los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos se pueden utilizar para detectar Dkk-1 en muestras biológicas. Tales usos permiten la identificación de células o tejidos que producen la proteína o sirven como diagnóstico para la detección de afecciones patológicas en las que Dkk-1 se produce en exceso o se produce de manera insuficiente.

Los anticuerpos y fragmentos que son proporcionados también se pueden usar en métodos para detectar una molécula que se une a Dkk-1. Se puede utilizar, por ejemplo una variedad de métodos de escrutinio competitivos. En algunos métodos, se ponen en contacto una molécula de Dkk-1 o un fragmento de la misma al cual se une un anticuerpo anti-Dkk-1, con un anticuerpo o fragmento descritos en la presente memoria junto con otra molécula (es decir, una molécula candidato). Una reducción en la unión entre el anticuerpo o fragmento y Dkk-1 es una indicación de que la molécula se une a Dkk-1. La unión del anticuerpo o fragmento se puede detectar utilizando una variedad de métodos, por ejemplo, un ELISA. La detección de la unión entre el anticuerpo anti-Dkk-1 o el fragmento a Dkk-1 se puede simplificar marcando de forma detectable el anticuerpo. En algunos métodos, se analiza adicionalmente una molécula que exhibe unión en el escrutinio inicial para determinar si ésta inhibe una actividad de Dkk-1 (p. ej., si la molécula activa de señalización de Wnt).

B. Tratamiento de trastornos óseos relacionados

En otros aspectos, algunos de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan se pueden utilizar para tratar pacientes con una variedad de enfermedades diferentes que incluyen, por ejemplo, enfermedades que son sensibles a la inhibición de la actividad de Dkk-1. Estos anticuerpos y fragmentos también se pueden utilizar para tratar enfermedades que son sensibles a la inducción de la señalización de Wnt. El término "paciente", según se utiliza en la presente memoria incluye sujetos humanos y animales a menos que se indique lo

contrario. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, una variedad de enfermedades que implican un trastorno óseo incluyendo afecciones de baja masa ósea, pérdida ósea sistémica, supresión de la formación de hueso y erosiones óseas. Algunos de los anticuerpos y fragmentos también se pueden utilizar en la reparación ósea.

- 5 Algunos de los anticuerpos o fragmentos tienen uso terapéutico en la estimulación de la actividad de los osteoblastos y el aumento de la densidad mineral ósea o de la masa ósea. Estos anticuerpos y fragmentos son por tanto útiles para el tratamiento de pacientes que sufren de diversos trastornos médicos que implican pérdida ósea excesiva o pacientes que requieren la formación de hueso nuevo, aun cuando puede no haber necesariamente una actividad excesiva de los osteoclastos. El bloqueo de la actividad de Dkk-1 da lugar a la activación de los
- 10 osteoblastos a través de la señalización transmitida por las proteínas Wnt. La actividad excesiva de los osteoclastos está asociada con numerosos trastornos osteopénicos que se pueden tratar con los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan, incluyendo osteopenia, osteoporosis, periodontitis, enfermedad de Paget, pérdida ósea debida a inmovilización, metástasis óseas líticas y artritis, incluyendo artritis reumatoide, artritis soriásica, espondilitis anquilosante y otras afecciones que implican la erosión ósea.
- 15 También se pueden tratar otras diferentes afecciones de baja masa ósea incluyendo una variedad de formas de osteoporosis, incluyendo, pero sin limitarse a, osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteoporosis inducida después del trasplante, osteoporosis asociada con quimioterapia (es decir, osteoporosis inducida por quimioterapia), osteoporosis inducida por inmovilización, la osteoporosis debida a descarga mecánica, y osteoporosis asociada con el uso anticonvulsivos. Las enfermedades óseas adicionales que se pueden tratar con algunos anticuerpos o
- 20 fragmentos incluyen la enfermedad ósea asociada con insuficiencia renal y enfermedades óseas nutricionales, gastrointestinales y/o hepáticas asociadas.

También se pueden tratar diferentes formas de artritis, incluyendo los ejemplos osteoartritis y artritis reumatoide. Los anticuerpos y fragmentos también se pueden utilizar para tratar la pérdida ósea sistémica asociada con la artritis (p. ej., artritis reumatoide). En el tratamiento de la artritis, los pacientes pueden beneficiarse mediante inyecciones

25 intralesionales o perilesionales de los presentes anticuerpos o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento del mismo se pueden inyectar adyacentes a o directamente en una articulación inflamada, estimulando de este modo la reparación de hueso dañado en el sitio.

Se sabe que algunos tipos de cáncer aumentan la actividad de los osteoclastos e inducen la resorción ósea, tales como el cáncer de mama y de próstata. El mieloma múltiple, que se origina en la médula ósea, también se asocia

30 con la pérdida de hueso, en parte, debido probablemente al aumento de la expresión de Dkk-1 por las células plasmáticas, que a su vez suprime la actividad de formación de hueso de los osteoblastos en las proximidades. La reducción de la actividad Dkk-1 por medio de la administración de anticuerpos sujeto o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos puede dar como resultado un aumento de la actividad de los osteoblastos que sirve para contrarrestar el exceso de actividad de los osteoclastos, reduciendo de ese modo la

35 gravedad de los trastornos mencionados anteriormente, reduciendo la erosión ósea e induciendo la formación de hueso nuevo en el paciente. El tratamiento con algunos de los anticuerpos específicos anti-Dkk-1 o fragmentos inmunológicamente funcionales puede inducir un aumento significativo en la densidad mineral ósea en un paciente que padece un trastorno osteopénico.

La inhibición de Dkk-1 con los anticuerpos o fragmentos inmunológicamente funcionales descritos en la presente

40 memoria también se puede utilizado en diversas aplicaciones de reparación ósea. Por ejemplo, ciertos anticuerpos y fragmentos pueden ser útiles para retrasar la osteolisis inducida por restos de desgaste asociada con articulaciones artificiales, la aceleración de la reparación de fracturas óseas, y la mejora de la incorporación de injertos de hueso en el hueso vivo circundante en el que se han injertado.

Los anticuerpos anti-Dkk-1 o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos se pueden administrar

45 solos o combinados con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, combinados con agentes para la terapia de cáncer, con agentes que inhiben la actividad de los osteoclastos o con otros agentes que potencian la actividad de los osteoblastos. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden administrar a pacientes de cáncer sometidos a terapia de radiación o quimioterapia. Las quimioterapias utilizadas combinadas con los anticuerpos de la invención pueden incluir antraciclinas, taxol, tamoxifeno, doxorubicina, 5-fluorouracilo, oxaloplatino, Velcade® (ácido [(1R)-3-

50 metil-1-[(2S)-1-oxo-3-fenil-2-[(pirazinilcarbonil)amino]propil]amino]butil]-borónico) y/u otros fármacos de molécula pequeña que se utilizan en el tratamiento del cáncer. Los pacientes con cáncer de mama se beneficiarán de la administración de un inhibidor de la aromatasa simultáneamente a los tratamientos combinados que comprenden un agente quimioterapéutico y un anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo.

Los anticuerpos anti-Dkk-1 y los fragmentos de inmunológicamente funcionales de los mismos se pueden utilizar

55 solos para el tratamiento de las afecciones referidas anteriormente que producen pérdida de masa ósea o combinados con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente promotor del crecimiento óseo (anabólico) o un agente anti-resorción ósea incluyendo, pero no limitado a: factores morfogénicos óseos denominados BMP-1 a BMP-12; factor de crecimiento transformante β y miembros de la familia de TGF- β ; factores de crecimiento de fibroblastos FGF-1 a FGF-10; inhibidores de interleucina-1 (incluyendo IL-1ra, anticuerpos para IL-1 y anticuerpos

60 para receptores de IL-1); inhibidores de TNF α (incluyendo etanercept, adalimumab y infliximab); inhibidores del

ligando RANK (incluyendo RANK soluble, osteoprotegerina y anticuerpos antagónicos que se unen específicamente a RANK o ligando de RANK); hormona paratiroidea, prostaglandinas de la serie E, bisfosfonatos y minerales que mejoran el hueso tales como fluoruro y calcio. Los agentes anabólicos que se pueden utilizar combinados con los anticuerpos de la invención y los fragmentos funcionales de los mismos incluyen la hormona paratiroidea y el factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF), en donde el último agente se compleja preferiblemente con una proteína de unión a IGF. Un antagonista del receptor de IL-1 adecuado para tal tratamiento combinado se describe en el documento WO89/11540 y un receptor de TNF de tipo 1 soluble adecuado se describe en el documento WO98/01555. Los antagonistas ilustrativos del ligando RANK se describen, por ejemplo, en el documento WO 03/086289, el documento WO 03/002713, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.740.511 y 6.479.635. Todas las patentes y solicitudes de patente mencionadas anteriormente se incorporan a la presente como referencia).

Además, los anticuerpos anti-Dkk-1 se pueden administrar a pacientes combinados con anticuerpos que se unen a células tumorales e inducen un efecto citotóxico y/o citostático sobre el crecimiento tumoral. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen aquellos que se unen a las proteínas de la superficie celular Her2, CDC20, CDC33, glicoproteína de tipo mucina y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) presentes en las células tumorales e inducen un efecto citostático y/o citotóxico sobre las células tumorales que presentan estas proteínas. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen HERCEPTIN® para el tratamiento de cáncer de mama y RITUXAN® para el tratamiento del linfoma no Hodgkin, y también incluyen fármacos basados en anticuerpos tales como ERBITUX® y Avastin®. Asimismo, la terapia combinada puede incluir como agentes de terapia del cáncer polipéptidos que inducen selectivamente la apoptosis en las células tumorales, tales como el polipéptido relacionado con TNF TRAIL.

Los anticuerpos sujeto o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos se pueden administrar concurrentemente con otros tratamientos y agentes terapéuticos que se administran para la misma afección. "Administración concurrente", según se utiliza en la presente memoria, incluye los tratamientos que se administran simultáneamente o sucesivamente. Los anticuerpos anti-Dkk-1 o los fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos se pueden administrar profilácticamente para evitar o mitigar el comienzo de la pérdida de masa ósea por el cáncer en fase temprana (fases I o II), o se pueden administrar para aliviar una afección existente de pérdida de masa ósea debida a metástasis en el hueso.

Los anticuerpos anti-Dkk-1 de la invención se pueden utilizar para evitar y/o tratar el crecimiento de células tumorales en el hueso. El cáncer que produce metástasis en el hueso se puede extender fácilmente ya que las células tumorales estimulan la resorción de la matriz ósea interna por los osteoclastos. El tratamiento con un anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo ayudará a mantener la densidad mineral ósea en el sitio de tales metástasis mediante la estimulación del aumento de actividad de los osteoblastos. Cualquier tipo de cáncer que tenga potencial de producir metástasis en el hueso puede ser evitado o tratado con un anticuerpo anti-Dkk-1 administrado antes o después de que se haya producido la metástasis.

El mieloma múltiple es un ejemplo de un tipo de cáncer que puede prevenirse y/o tratarse con un anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Los pacientes afectados presentan típicamente una pérdida de masa ósea debida a un aumento de la activación de los osteoclastos en regiones localizadas del hueso. Las células de mieloma producen directa o indirectamente ligando RANK, una proteína que activa los osteoclastos que da como resultado la lisis del hueso que rodea las células del mieloma incrustadas en los espacios de la médula ósea. Los osteoclastos normales adyacentes a la célula de mieloma producen a su vez IL-6, lo que conduce al crecimiento y proliferación de células de mieloma. Además las células de mieloma múltiple producen Dkk-1 inhibiendo de ese modo la actividad de los osteoblastos y fomentando adicionalmente la actividad de resorción ósea en esta enfermedad. El tratamiento de un animal con un anticuerpo anti-Dkk-1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo instigará la actividad de los osteoblastos, produciendo de ese modo un aumento de la masa ósea en el sitio de los tumores. Tal tratamiento puede dar como resultado la reducción de dolor óseo, y puede bloquear metástasis adicionales en el hueso mediante la prevención de la actividad de resorción que libera los nutrientes óseos utilizados por las células tumorales. En el tratamiento de esta enfermedad, el anticuerpo anti-Dkk-1 o el fragmento inmunológicamente funcional del mismo se pueden administrar concurrentemente con anticuerpos antagónicos dirigidos contra el ligando de RANK o anticuerpos contra IL-6.

VIII. Kits

También se proporcionan kits que incluyen un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional o una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria. Algunos kits incluyen tal anticuerpo, fragmento o composición en un recipiente (p. ej., vial o ampolla), y también pueden incluir instrucciones para uso del anticuerpo o fragmento en las diferentes aplicaciones de detección, escrutinio y terapéuticas descritas anteriormente. El anticuerpo, fragmento o composición pueden estar en diversas formas, incluyendo, por ejemplo, como parte de una disolución o como un sólido (p. ej., polvo liofilizado). Las instrucciones pueden incluir una descripción de cómo preparar (p. ej., disolver o resuspender) el anticuerpo o fragmento en un fluido apropiado y/o la forma de administrar el anticuerpo o fragmento para el tratamiento de las enfermedades descritas anteriormente (p. ej., trastornos óseos, tales como baja masa ósea, pérdida ósea sistémica, supresión de la formación de hueso y erosiones óseas).

Los kits también pueden incluir otros varios componentes, tales como tampones, sales, iones de metales complejantes y otros agentes descritos anteriormente en la sección de composiciones farmacéuticas. Estos

componentes pueden ser incluidos con el anticuerpo o fragmento o pueden estar en recipientes separados. Los kits también pueden incluir otros agentes terapéuticos para la administración con el anticuerpo o fragmento. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes para el tratamiento de cánceres, agentes promotores de hueso y anticuerpos que se unen a las células tumorales, y otros agentes enumerados anteriormente.

5 Ejemplo 1

Generación de anticuerpos monoclonales para Dkk-1 murina en ratones y ratas

A. Inmunización

Se clonó Dkk-1 murina recombinante que se había utilizado como antígeno a partir de una biblioteca de ADNc de placenta de ratón utilizando secuencias disponibles públicamente (Núm. de Acceso GenBank AF030433.1). La clonación de Dkk-1 humana, que se había utilizado para someter a ensayo la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-Dkk-1 de ratón, fue como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.344.541. Para preparar la Dkk-1 de ratón para su uso como un antígeno, se sembraron botellas rodadoras 850 cm² con 4-5 x 10⁷ células 293T adherentes (células de riñón de embriones humanos, obtenidas de Cellular and Molecular Technologies) durante la noche en DMEM con FBS al 5%, 1x aminoácidos no esenciales, 1x pen/estrept/glut y 1x piruvato de sodio (DMEM completo, Gibco, Grand Island NY).

Las células se transfectaron el día siguiente. Se diluyeron 675 µl de reactivo de transfección FuGene6 en 6,75 ml de DMEM sin de suero (Roche Diagnostics) y 112,5 µg de ADN pcDNA3.1 (este plásmido expresa Dkk-1 de ratón conjugada con FLAG). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió la mezcla de ADN a cada botella rodadora (alrededor de 30 botellas en total) y se incubó en una incubadora con CO₂ al 5%. Después de 24 horas, se añadieron a cada botella 100 ml de DMEM sin suero que contenía 1x aminoácidos no esenciales, 1x pen/estrept/glut, 1x piruvato de sodio, 1x suplemento de insulina-transferrina-selenio (Invitrogen) y DMSO al 0,5%. El medio se recogió y se sustituyó por medio de nueva aportación cada 48 horas durante 14 días. La Dkk-1 de ratón se purificó a partir del medio de cultivo aclarado reunido.

Los ratones y las ratas se inmunizaron como se describe a continuación mediante inyección con Dkk-1 murina recombinante completa. En algunos experimentos, se inyectó a los ratones (pero no las ratas) muDkk-1 recombinante que se había conjugado antes de la inyección a un péptido PADRE (Epimmune). La conjugación se llevó a cabo haciendo reaccionar la Dkk-1 murina con un exceso molar de 25 veces de 6 maleimideocaproato de N-succinimidilo (MICA) (Fluka Núm. 63177) a temperatura ambiente durante 3 horas. La Dkk-1 murina activada con maleimida se separó del MICA no tratado por medio de una columna de 8 mm x 125 mm cargada con Sephadex G-25. Se incubó 1 mg de la Dkk-1 murina activada con maleimida con 0,5 mg de péptido PADRE (AKFVAAWTLKAAAC; SEC ID NO: 13) y 0,5 mg de un segundo péptido PADRE (CAKXVAAWTLKAAA (X = ciclohexil-alanina); SEC ID NO: 14) a temperatura ambiente durante 1 hora y después se sometió a diálisis frente a PBS.

Se inmunizaron ratones Balb/c y ratones C57BL/6 (Jackson Laboratories), así como ratones AGP3 transgénicos (Khare et al, *PNAS* 97: 3.370-3375, 2000) eligiendo como diana los ganglios linfáticos de drenaje periféricos o el bazo como se describe a continuación. Se inmunizaron ratas Lewis eligiendo como diana solo el bazo.

Para dirigirse a los ganglios linfáticos, se administraron inyecciones 5 veces en 12 puntos por vía subcutánea (6 dorsal, 6 ventral) a lo largo de 10-13 días utilizando una proporción 1:1 de Dkk-1:coadyuvante. El adyuvante utilizado fue o bien mezcla de adyuvante de Freund completo/incompleto (Pierce) o bien RIBI (Corixa). De uno a tres días después de la última inyección, los ganglios linfáticos periféricos de cada ratón inyectado se cosecharon y se fusionaron con células de mieloma SP2/0.Ag14 murinas (Núm. ATCC CRL 1581) utilizando fusión celular dielectroforética, como se describe a continuación. Para las ratas inyectadas, se extirparon los ganglios linfáticos 13 días después de la última inyección de antígeno y los linfocitos se fusionaron con células compañeras de fusión Y3 Ag 1.2.3 (Núm. ATCC CRL 1631), que derivan de rata.

Para dirigirse al bazo, los ratones se inyectaron por vía subcutánea en 2-4 sitios utilizando una proporción 1:1 o bien de muDkk-1:coadyuvante completo de Freund o bien muDkk-1-PADRE:coadyuvante completo de Freund. Se administró una segunda inmunización 2 semanas después utilizando la proporción 1:1 de muDkk:coadyuvante RIBI o muDkk-PADRE:coadyuvante RIBI en 2 sitios subcutáneos y 1 sitio intraperitoneal. Se tomaron muestras de sangre 10 días después para analizarlas para determinar la respuesta de anticuerpos anti-mDkk-1. Los mejores respondedores se reforzaron mediante inyección intraperitoneal con mDkk-1 en PBS. Cinco días más tarde, los bazos se extrajeron para la preparación de linfocitos que se iban a fusionar con las células de mieloma SP2/0.Ag14 murinas.

B. Protocolo fusión de linfocitos

Se fusionaron linfocitos aislados de los ganglios linfáticos o el bazo de animales inmunizados con células SP2/0.Ag14 murinas o Y3 Ag 1.2.3 de rata utilizando el siguiente protocolo optimizado.

Se prepararon suspensiones de células individuales a partir de células de bazo o células de ganglios linfáticos periféricos (PLN), y se filtraron a través de un filtro de células de 100 µm en un tubo de 50 ml, utilizando 30-40 ml de medio sin suero. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para recoger las células. Para lisar los glóbulos rojos (cuando estuvieran presentes), las células se resuspendieron en 10 ml de tampón de lisis RBC (8,3 g/L de cloruro de amonio en Tris/HCl 0,01 M, pH 7,2), y se añadió tampón de lisis adicional hasta un total de 30 ml. Las células se dejaron reposar durante 2-5 minutos, después se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. Este procedimiento de lisis se repitió si persistió un color rojo en el sedimento. Después de la etapa de lisis, las células se resuspendieron en un medio SF, se retiró una alícuota para el recuento, a continuación, las células se lavaron en un total de 50 ml de medio SF.

Antes de ser utilizadas para la fusión, estas células se sometieron a dos rondas del siguiente procedimiento de "selección". Esta selección se realizó con el fin de seleccionar las células que eran resistentes a estas manipulaciones y se repitió dos veces de la siguiente manera. La selección consistió en someter las células a varias etapas del protocolo de fusión, a saber, centrifugación, incubación en tampón de fusión ECF (Cytopulse Sciences Cytofusion Medium C, Núm. de catálogo CPS-LCM) y exposición a la fase de alineamiento actual del proceso de fusión. Las células de mieloma SP2/0.AG 14 que se habían sometido a esta selección se denominaron células "SP2/0-ECF-F" y las células Y3.AG 1.2.3 habían experimentado esta selección se denominaron células "ECF-Y3-F".

Se llevó a cabo una etapa de enriquecimiento de células B solo para ratones, excepto que no se llevó a cabo cuando se utilizaron ratones AGP3. En resumen, esta etapa consistió en suspender 10^7 células de bazo o de los ganglios linfáticos en SF, añadir 10 µl de cuentas magnéticas CD 90⁺ (Miltenyi Biotec Núm. de Cat. 130-049-101) que se habían lavado previamente con medio SF, mezclar suavemente e incubar a 4-12°C durante 15 minutos. A continuación, las células se diluyeron 1:3 con medio y se filtraron a través de un filtro de 40 micras. Se cargaron hasta 2×10^8 células totales (10^8 células positivas) en una Columna LS+ (Miltenyi Biotec Núm. de Cat 130-042-401) y se recogió el eluyente como la fracción CD 90⁺.

Antes de llevar a cabo la fusión, las cámaras de fusión se esterilizaron con etanol del 70%, después se secaron al aire en una campana estéril. Si se había realizado el enriquecimiento de células B, se combinaron 1:1 mieloma y células CD 90⁺ y se mezclaron bien en un tubo de 50 ml. Cuando no se había realizado el enriquecimiento de células B, se combinaron mieloma y esplenocitos o PMN en una proporción 1:2,5. Se añadió medio sin suero hasta 40 ml y las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. Los sedimentos celulares se lavaron dos veces en 25 ml de tampón de fusión isoosmolar (ECF). Las células se resuspendieron en un volumen de ECF para dar una concentración final de 2×10^6 a 1×10^7 por ml. Se transfirieron 2 ml de las células suspendidas a la cámara de fusión de 2 ml, y se conectaron los cables. Se aplicaron 60 V de CA durante 30 segundos, seguido de 3 pulsos sucesivos separados 1 segundo de 1500 V de CC durante 30 microsegundos, seguido de 60 V de CA durante 3 segundos. Durante este procedimiento la exposición de las células al tampón de fusión isoosmolar; incluyendo lavados, se mantuvo durante 3 horas o menos. Después de la fusión, siempre se permitió que las células se asentaran sin interrupciones en la cámara de fusión a temperatura ambiente durante 15-45 minutos antes de continuar.

Las células fusionadas se retiraron de la cámara de fusión y se resuspendieron a $1-5 \times 10^5$ células/ml en medio de BD Quantum Yield (Becton Dickinson) que contenía FBS con bajo contenido de IgG al 15% (Gibco), 1x PSG (Gibco), 55 µm de β-mercaptoetanol (Gibco), 1x OPI (Sigma) y factor de clonación Origen al 5% (Igen International). En experimentos que involucraban el compañero de fusión Y3Ag1.2.3, se sustituyó el factor de clonación Origen por 1 ng/ml de IL-6. Los pocillos individuales de placas de cultivo de 96 pocillos (Falcon) se sembraron con 100 µl de las células y se incubaron a 37°C en CO₂ al 6,5%. Al día siguiente, se añadieron 100 µl del mismo medio que contenía 1xHAT (Sigma) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 7 días más, después de lo cual el medio se retiró y se reemplazó por 200 µl del mismo medio. El escrutinio de ELISA se realizó después de un total de 10-14 días de incubación.

Todas las fusiones se realizaron en Cytopulse Sciences Cytofusion Medium C Cell (Núm. de Cat. CPS-LCM). La fusión celular con las células de mieloma se llevó a cabo como sigue, utilizando ECM 2001 y Enhancer 400 Pulse Monitor. Las condiciones utilizadas se muestran a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5

Condición	Ratón (SP2/0-ECF-F)	Rata (Y3-ECF-F)
<i>Alineamiento:</i>	60v, 30 seg	60v, 30 seg
<i>Rotura de la membrana:</i>	1500V, 30µs, 3X	2000V, 30µs, 3X
<i>Pulso post-fusión:</i>	60V, 3 seg	60V, 3 seg

Generalmente, los linfocitos fusionados se congelaron directamente después de la fusión para su posterior análisis. Para la congelación, se sembraron matraces t-150 con híbridos recién fusionados a una densidad de células de mieloma de entre $1-3 \times 10^5$ /ml en medio de fusión, a continuación, se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, las células se cosecharon y se congelaron en un FBS al 90% que contenía DMSO al 10%.

Ejemplo 2

Aislamiento de hibridomas que producen anticuerpos neutralizadores contra Dkk-1

Los hibridomas descritos en el Ejemplo 1 se escrutaron en primer lugar utilizando un análisis ELISA. Se prepararon placas para el ELISA mediante la adición de 50 µl de una muDkk-1 recombinante de 1-5 µg/ml en disolución salina tamponada con fosfato (PBS; GIBCO) a cada pocillo de una placa de ELISA de alta unión (COSTAR®) durante 1 hora. A continuación, los pocillos se incubaron durante 1 hora con 200 µl de PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% (BSA) y de suero de cabra al 1% (GIBCO) para bloquear la unión no específica de los sobrenadantes de los hibridomas. Las placas se lavaron con PBS, se añadieron 40 µl de sobrenadante de hibridoma a cada pocillo, a continuación, se incubaron las placas durante una hora. Después de otro lavado con PBS, se añadieron 50 µl de una dilución 1:10.000 de anti-mulG de cabra (específico de Fc) que se había conjugado con HRP (Pierce) o anti-IgG H + L de rata de cabra conjugado con HRP (Zymed) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo en PBS, después de lo cual se añadieron 50 µl de sustrato ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico; KPL) por pocillo. Este sustrato produce un producto de color verde soluble en agua tras la reacción con HRP. La densidad óptica se leyó usando un lector de placas Spectramax (Molecular Devices) y los datos se interpretaron utilizando el programa Softmax pro (Molecular Devices). La siguiente Tabla 6 muestra el número de clones positivos para el ELISA obtenidos a partir de cada categoría de animales inmunizados. Todos los hibridomas reactivos con el antígeno se expandieron en cultivo celular para la producción y el ensayo adicional de los anticuerpos.

Tabla 6

Anticuerpo	Antígeno	Fuente de linfocitos	Animales	Positivo para el ELISA	Positivo para el análisis de luciferasa
mDkk-1 de ratón	mDkk-1	Ganglios linfáticos periféricos	2 x ratones transgénicos AGP3, 2 x Balb/C	9	3
mDkk-1 de rata	mDkk-1	Ganglios linfáticos periféricos	2 x ratas Lewis	48	7
mDkk-1 de ratón	mDkk-1 conjugada con PADRE	Bazo	2 x C57BL/6	78	0
mDkk-1 de ratón	mDkk-1 conjugada con PADRE	Ganglios linfáticos periféricos	3 x C57BL/6	593	0

A. Análisis TCF/lef-luciferasa

Se sometieron a ensayo varios cientos de los hibridomas obtenidos como se ha descrito en el Ejemplo 1 utilizando un constructo informador TCF/lef-luciferasa en el que la expresión de luciferasa está bajo el control de Wnt. Cuando las células transfectadas con este constructo se exponen a Wnt biológicamente activa, se induce la actividad luciferasa. La actividad luciferasa inducida por Wnt se puede suprimir mediante la adición de proteína Dkk-1 recombinante a las células que contienen este constructo. Para los presentes experimentos, se añadieron primero tanto Wnt3a como Dkk-1 a las células en cantidades optimizadas para suprimir aproximadamente el 80% de la expresión de la luciferasa dependiente de Wnt. Se espera que la nueva adición de un anticuerpo anti-Dkk-1 a estas mismas células restaure la actividad Wnt, lo que da como resultado de este modo un aumento de la expresión de luciferasa. Los sobrenadantes de los hibridomas se sometieron de este modo a ensayo para determinar si eran capaces de restaurar la expresión de luciferasa en las células transfectadas con el constructo Wnt/luciferasa. La actividad luciferasa se cuantificó como se describe a continuación.

El día cero, se cultivaron en placa células 293T recién tripsinizadas a $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas con fibronectina. A continuación las células se co-transfectaron con ADN que codificaba luciferasa de luciérnaga y ADN que codificaba luciferasa de Renilla. El día 1, para cada pocillo, se mezclaron 10 ng de ADN de TCF/lef-luciferasa (TOPflash de Upstate, Núm. 21-170) y 1 ng de ADN de luciferasa de Renilla (pRL-TK; Promega Núm. E2241) en 30 µl de DMEM (menos antibiótico) con 20 µl de reactivo de transfección Polyfect® 1:10 (Qiagen 301107) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de un complejo Polyfect-ADN. Después de esta incubación, se añadieron 100 µl de medio de crecimiento al complejo. A continuación, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se añadió al pocillo el complejo en medio de crecimiento. El medio de crecimiento de los pocillos se retiró tres horas más tarde y se reemplazó por medio acondicionado.

Después de tres días, las células se lavaron una vez con PBS, y se añadieron a cada pocillo 40 µl del tampón de lisis pasiva recién elaborado incluido en el kit Dual Luciferase (Promega Núm. PAE1960). El tampón de lisis pasiva también se encuentra disponible por separado de Promega (Núm. E1941). Las placas se sacudieron durante 20 minutos a temperatura ambiente para inducir la lisis. Se utilizaron 10 µl de producto lisado por análisis para llevar a cabo el análisis Dual Luciferase en placas de 96 pocillos de color blanco (VWR 62402-980), utilizando Promega Núm. PAE1960 de acuerdo con el protocolo del fabricante. Utilizando Lmax de Molecular Devices (luminómetro con inyectores duales), se registraron las señales luminiscentes de las luciferasas tanto de luciérnaga como de Renilla y se utilizó la proporción de esas señales para determinar la CE50 y para trazar curvas de dosis-respuesta. En primer lugar, el sustrato de la luciferasa de luciérnaga se inyectó en un pocillo con producto lisado celular y se registró la señal luminiscente; a continuación se inyectó el sustrato de luciferasa de Renilla en el mismo pocillo y se registró la segunda señal luminiscente resultante. La Tabla 2 anterior informa sobre los números de hibridomas que indujeron un resultado positivo en este análisis, indicando de ese modo que los anticuerpos monoclonales que producían eran capaces de neutralizar Wnt.

Escrutinio de hibridoma utilizando un análisis de células ST2

Se utilizó la línea celular de estroma ST2 (RIKEN, Cell RCB0224), derivada de la médula ósea de ratón, para el escrutinio adicional de los hibridomas que dieron positivo en el análisis de luciferasa. En respuesta a la señalización Wnt3a, células ST2 se diferencian en osteoblastos que expresan proteína marcadora de osteoblastos fosfatasa alcalina (ALP). La inducción de ALP por Wnt3a en estas células se puede bloquear mediante la adición del inhibidor de Wnt Dkk-1 al medio de cultivo. La expresión de ALP media se puede restaurar en estas condiciones exponiendo las células a un agente capaz de neutralizar la actividad de Dkk-1, tal como un anticuerpo neutralizador anti-Dkk-1. Por consiguiente, los hibridomas se escrutaron para determinar su capacidad para restaurar la actividad de ALP en células ST2 en presencia de Wnt3a.

En la preparación para el análisis, las células ST2 se cultivaron en MEM-α, que contenía suero bovino fetal al 10%, 1 x penicilina/estreptomicina/glutamina y 1 x piruvato de sodio (todos estos reactivos se obtuvieron de GIBCO). Las células se cultivaron en placa a 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos con 22 µl de medio de cultivo por pocillo. Las células se incubaron durante la noche durante un máximo de 24 horas a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%.

En el día cero del análisis, se añadieron a cada pocillo 200 ng de Dkk-1 murina o humana recombinante a 20 µl de tampón más 20 µl de medio acondicionado con Wnt3a derivado de una línea celular estable L-Wnt3a murina. El medio condicionado proporcionó una fuente de Wnt3a. Estas cantidades de estos dos reactivos (es decir, Dkk-1 y Wnt3a) se ajustaron entre sí para permitir aproximadamente 10% de todo el intervalo dinámico de la expresión de ALP en estas células. A continuación, cada anticuerpo que se iba a someter a ensayo se tituló en DMEM a intervalos 1:2 para determinar su capacidad para restaurar la actividad de ALP. En el extremo superior del intervalo de prueba, cada pocillo recibió 100 µg de anticuerpo por ml. El anticuerpo policlonal anti-Dkk-1 humana de cabra (R & D Systems, Núm. de Cat: AF1096) sirvió como control positivo. Se utilizó como control negativo cualquier medio acondicionado transfectado de manera simulada o el medio de cultivo ST2 descrito anteriormente. Después de la adición de anticuerpo o medio de control, las placas se incubaron a 37° durante 72 horas.

El día 3, los medios se retiraron y las células se enjuagaron con Tris 0,1 M (pH 7,4). A continuación, se añadieron por pocillo 150 µl de Igepal CA-630 al 0,1% (Sigma: Núm. de Cat. I-3021) en tampón de glicina, después de lo cual las placas se congelaron a -80°C y después se descongelaron. Una vez descongeladas, se transfirieron 100 µl de cada producto lisado celular a nuevas placas de 96 pocillos que iban a analizar para determinar la ALP. Como sustrato, se añadieron 100 µl de p-nitrofenol fosfato disódico de 4 mg/ml (Sigma: Núm. de Cat. 104-40) en tampón de glicina (glicina 0,1 M, MgCl₂ 1 mM, pH 10,5) por pocillo a una concentración de sustrato final de 2 mg/ml. Tras la hidrólisis por ALP, este sustrato produce p-nitrofenol, que tiene un color amarillo. Las placas se incubaron a continuación durante 30 minutos a 37C para permitir la hidrólisis del sustrato por ALP. Después de esta incubación, las reacciones se detuvieron mediante la adición de 50 µl de NaOH 0,5 N por pocillo. Las placas se leyeron a 405-410 nM. El análisis de ALP se normalizó utilizando BCA Protein Assay, realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce Núm. de Cat 23223, 23224). La normalización (nmoles PNP /mg de proteína) se llevó a cabo para compensar la variación del número de células encontrada en cada pocillo que podría interferir en la determinación de la inducción de la fosfatasa alcalina real.

Los resultados del análisis de ALP se compararon con los controles positivos y negativos y los resultados se refirieron en la Tabla 7. Los datos de la Tabla 7 indican que del gran número de clones sometidos a ensayo, los dos que expresaban la actividad de neutralización más potente fueron 1F11-2 y 11H10, ambos derivados de rata.

Tabla 7

Fuente de anticuerpos	Dkk-1 de ratón	Dkk-1 humana
	CE50 (nM)	CE50 (nM)
Monoclonal de Ratón		
5H6-1	2068	479
7D6-1	490	1465
7D6-3	770	533
10A7-1	272	1032
10A7-3	276	63
Monoclonal de rata		
1F11-1	18,3	33,8
1F11-2	24,0	25,5
4A3	1113	1128
6d8	5908	8852
7H52	2706	481
8D11	604	1567
8D12	1346	537
13F41	190	1027
13F42	2549	2183
11H10	6,1	3,5
Policlonal de Cabra		
R & D	57,9	14,1

En resumen, se escrutaron un total de 19.250 hibridomas en el análisis ELISA. De estos, 728 se unieron a Dkk-1 en los análisis de ELISA y 10 fueron positivos en uno o ambos análisis de neutralización (análisis de informador TCR/lef o análisis de células ST2). Los datos de la Tabla 7 indican que de los clones positivos, el clon 11H10 tuvo la mejor actividad. Por ejemplo, el clon 11H10 tuvo una CE₅₀ de 3,5 nM frente a Dkk-1 humana 8 nm y una CE₅₀ de 6,1 nM frente a Dkk-1 murina 8 nm.

Ejemplo 3

Unión de afinidad de anticuerpos monoclonales contra Dkk-1

Como se observó anteriormente, los hibridomas que mostraban la mejor actividad neutralizadora de Dkk-1 en los análisis basados en células fueron 11H10 y 1F11 derivados de rata (véase el Ejemplo 2). El anticuerpo 11H10 es del isotipo IgG₁. Este ejemplo ilustra que estos dos anticuerpos se unen ambos con alta afinidad a Dkk-1 murina, de rata y humana. En consonancia con su mejor actividad neutralizadora, el clon 11H10 también tuvo una afinidad superior por Dkk-1 en estos análisis que 1F11.

Se realizaron análisis cinéticos para estudiar la unión de los anticuerpos 11H10 y 1F11 a Dkk-1 utilizando BiaCore 2000 (BIACORE, Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron Dkk-1 de rata (260 µg/ml), Dkk-1 murina (690 µg/ml) y Dkk-1 humana (900 µg/ml) sobre la superficie de un chip CM5, y se inyectaron diversas concentraciones (de 0,78 nM a aproximadamente 100 nM) de los anticuerpos sobre las superficies con Dkk-1 inmovilizadas. Los sensogramas de unión se analizaron utilizando BIAevaluation 3.2. Los datos se resumen en las Tablas 8 y 9 a continuación.

Tabla 8. Cinética de unión de 1F11 determinada mediante BiaCore

	Dkk-1 de rata	Dkk-1 de ratón	Dkk-1 humana
k_a (1/Ms)	$1,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
k_d (1/s)	$3,1 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$
K_d (M)	$2,2 \times 10^{-9}$	$2,9 \times 10^{-9}$	$2,8 \times 10^{-9}$

Tabla 9. Cinética de unión de 11H10 determinado mediante BiaCore

	Dkk-1 de rata	Dkk-1 de ratón	Dkk-1 humana
k_a (1/Ms)	$5,4 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$
k_d (1/s)	$1,54 \times 10^{-5}$	$<5 \times 10^{-5}$	$<5 \times 10^{-5}$
K_d (pM)	290	<100	<100

Resultó evidente a partir de los resultados de BiaCore que 11H10 tenía la mayor afinidad por Dkk-1, y que su afinidad por la diana excedió los límites de sensibilidad del análisis BiaCore. Por consiguiente, se evaluó adicionalmente la afinidad de unión de 11H10 a Dkk-1 mediante un análisis de unión en equilibrio utilizando el KinExA[®] 3000 más sensible (Sapidyne Instruments Inc., Boise, ID). Para estas mediciones, se recubrieron previamente cuentas Reacti-Gel 6X (Pierce, Rockford, IL) con Dkk-1 de ratón, de rata o humana y se bloquearon con BSA. Se mezclaron 100 pM, 300 pM, o 1000 pM del anticuerpo 11H10 con diversas concentraciones de Dkk-1 humana, de ratón o de rata, con una concentración que oscilaba de 1 pM a 50 nM, y se equilibraron a temperatura ambiente durante 8 horas. A continuación las mezclas se hicieron pasar sobre las cuentas recubiertas con Dkk-1. Se cuantificó la cantidad de anticuerpo anti-Dkk-1 unido a las cuentas utilizando un anticuerpo anti-IgG de rata de cabra marcado con una etiqueta fluorescente (Cy5; Jackson Immuno Research, West Grove, PA). La cantidad de señal fluorescente medida fue proporcional a la concentración de anticuerpo anti-Dkk-1 libre en cada mezcla de reacción en equilibrio. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se obtuvo a partir de la regresión no lineal de las curvas de competición utilizando un modelo de unión homogénea de curva dual de un sitio usando el programa KinExA. Los resultados de los análisis RinExA para 11H10 indicaron que la K_d para la Dkk-1 humana fue de $1,3 \times 10^{-10}$ M, y para la Dkk-1 de ratón y de rata fue de $1,65 \times 10^{-10}$ M y $5,4 \times 10^{-10}$ M, respectivamente.

Los estudios cinéticos de unión se llevaron a cabo con varias combinaciones diferentes de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas (pares idénticos de cada cadena) enumeradas en la Tabla 1 anterior. En general, estos anticuerpos tienen valores de k_a entre 10^4 y 10^6 /Mxsegundos, y unos valores k_{off} (k_d) de entre 10^{-4} y 10^{-5} s⁻¹.

Ejemplo 4

Ensayo in vivo de hibridoma 11H10

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si la neutralización de Dkk-1 en un modelo animal de ratón joven causaría un aumento en la densidad mineral ósea (DMO) y en la osteocalcina en suero, un marcador de formación ósea.

Para estos experimentos, el anticuerpo 11H10 se purificó a partir del medio de células de hibridoma 11H10 cultivadas. El medio de cultivo recogido se concentró 12 veces utilizando un dispositivo de ultrafiltración Pellicon (Amicon) equipado con un casete de pantalla de canal MWCO de 50 kD (Millipore). El medio concentrado se filtró a través de un filtro de poro de 0,2 μ m, después se unió a Protein G Sepharose (Pharmacia). Después de lavar la Protein G Sepharose con al menos cuatro volúmenes de PBS, el anticuerpo se hizo eluir con tampón de elución de IgG (Pierce), después, se tamponó a pH neutro mediante la adición de Tris-HCl 1M al 5% v/v. A continuación, el anticuerpo se dializó frente a PBS. El producto dializado se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m y se sometió a ensayo para determinar la endotoxina con viales de 0,06 UE/ml Pyrotell LAL (Associates of Cape Cod). La concentración de proteína en el anticuerpo purificado se determinó mediante absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción de 1,35.

A ratones BDF-1 macho de cuatro semanas de edad (APR 233.757, Charles River) se les inyectó subcutáneamente a lo largo de un periodo de tres semanas una de tres dosis del anticuerpo monoclonal 11H10 purificado (5, 10 ó 20 mg/kg), como se indica en la tabla 10. Se utilizaron cinco ratones por grupo. A los ratones de control negativo se les inyectó vehículo (PBS), y los ratones de control positivo se les inyectó hormona paratiroidea (aminoácidos 1-34), que es conocida por estimular el aumento de densidad ósea en estos ratones (Dempster et al., Endocrine Reviews 14 (6): 690-709 (1993)). Se utilizaron 100 μ g/kg de PTH (1-34) en HCl 0,001 N, NaCl 0,15 M, BSA al 2%, pH 8,0 por inyección. Este experimento se repitió una segunda vez exactamente como se muestra en la Tabla 10, pero con un

grupo adicional de ratones de control negativo que recibieron 20 mg de IgG de rata. Además, estos experimentos se han repetido con 11H10 expresado recombinantemente.

Tabla 10

Grupo	Dosis	Programa	N
Vehículo	1xPBS	3x/semana MWF	5
Control de PTH	PTH B.	5x/semana MF	5
PTH	100 µg/kg	5x/semana MF	5
11-H-10	5 mg/kg	3x/semana MWF	5
11-H-10	10 mg/kg	3x/semana MWF	5
11-H-10	20 mg/kg	3x/semana MWF	5

Se recogió sangre al inicio del estudio (día 0) y los días 3, 5, 7, 14 (retro-orbital), y el día 21 (punción cardíaca terminal) para los análisis de osteocalcina y paneles de química clínica.

Los niveles de osteocalcina en suero se determinaron utilizando un análisis kit de inmunorradiométrico (IRMA) específico para la osteocalcina de ratón (Immunotopics, Inc. San Clemente, CA). Las muestras de suero antes del análisis se equilibraron a temperatura ambiente y todos los análisis se realizaron por duplicado. Los análisis emplearon dos anticuerpos diferentes para osteocalcina de ratón. El primero fue un anticuerpo de cabra policlonal purificado por afinidad que reconoce la región media del extremo C-terminal de la molécula de osteocalcina; este anticuerpo se inmovilizó sobre cuentas de plástico para ser utilizado como reactivo de captura. El otro anticuerpo fue un anticuerpo policlonal purificado por afinidad que reconoce el extremo amino terminal de la molécula de osteocalcina, este anticuerpo se marcó radiactivamente para su uso en la detección de la osteocalcina. Las muestras de suero de ratón se incubaron con una cuenta recubierta de anticuerpo y el anticuerpo marcado con ¹²⁵I a temperatura ambiente durante 18 a 24 horas para permitir que la osteocalcina se uniera al anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo radiomarcado formara un "sándwich" unido a las cuentas marcadas. Después de la incubación, las cuentas se lavaron dos veces para eliminar el anticuerpo marcado no unido, se contaron en un contador gamma, y las cuentas se corrigieron para el fondo. En estos análisis, la reactividad del complejo de anticuerpo fue directamente proporcional a la cantidad de osteocalcina de ratón en el suero. Las concentraciones de osteocalcina de ratón en las muestras se determinaron directamente a partir de una curva patrón generada a partir de la osteocalcina de control proporcionada para este propósito en el kit.

Al rededor del día 3 y a partir de entonces, todas las dosis de 11H10 habían inducido un aumento de la osteocalcina en comparación con los ratones tratados con vehículo. La magnitud del aumento era dependiente de la dosis. Para las dosis de 10 mg/kg y de 20 mg/kg, la magnitud del aumento fue estadísticamente significativa frente al vehículo el día 5, y para la dosis de 20 mg/kg, se mantuvo estadísticamente significativa el día 7. Para todas las dosis administradas, se observó una inducción de osteocalcina tan pronto como tres días después de que hubiera comenzado el tratamiento con 11H10 y las magnitudes de los aumentos globales observados fueron similares a o mayores que la observada en los animales tratados con PTH.

Para el análisis de la DMO, se tomaron radiografías de ratón completo al final de la primera, segunda y tercera semanas a 56 kVp durante 49 segundos utilizando un sistema de rayos X Faxitron Núm. 43855A (Buffalo Grove, IL) y Película Kodak X-OMAT TL (Rochester, NY). Las películas de rayos X resultantes se inspeccionaron visualmente para determinar el aumento de densidad ósea en 10 huesos diferentes. No se observaron aumentos en los grupos tratados con vehículo o tampón de PTH. Sin embargo, los grupos tratados con PTH (1-34) o 11H10 mostraron un incremento de la densidad en cinco o más huesos en una semana, y en la mayoría de los diez huesos al final de la semana tres.

Al final del periodo de inyección de tres semanas, se llevó a cabo el análisis DMO pQCT en la metáfisis proximal de la tibia y se midió para determinar la densidad total, trabecular y cortical. La DMO total medida mediante pQCT mostró una respuesta positiva a la dosis más alta de 11H10, en su mayor parte debida a un aumento de la DMO trabecular. La Tabla 11 presenta las mediciones de la DMO obtenidas en uno de los dos experimentos que se habían llevado a cabo. Se obtuvieron resultados similares en ambos experimentos. Los números de la Tabla 11 representan el porcentaje de cambio en comparación con el control de vehículo. Los asteriscos de la Tabla 11 indican que hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo con 11H10 y el grupo de control (ANOVA p < 0.05). En general, la cantidad de aumento de DMO inducida por 11H10 fue comparable a la cantidad de aumento inducida por el control positivo de PTH (1-34).

Tabla 11. Densidad mineral ósea en los ratones tratados con 11H10

% de Cambio en Comparación con Ratones a los que se Había Inyectado Vehículo			
Dosis de 11H10	Densidad total (metáfisis tibial proximal)	Densidad trabecular (metáfisis tibial proximal)	Densidad cortical (metáfisis tibial proximal)
5 mg/kg	4,1	9,8	-0,49
10 mg/kg	10,2	16,8 *	0.59
20 mg/kg	12,2 *	19,5 *	4,3
PTH-(1-34) 100 µg/kg	10,6	16,7	7,9
Control con Tampón PTH	-2,2	2,0	-5,3

Ejemplo 5

Ensayo in vivo de diferentes anticuerpos

Para facilitar aún más la capacidad de neutralizar Dkk1 para aumentar la masa ósea se trataron ratones tanto jóvenes (6 semanas de edad) como viejos (8,5 meses de edad) con 11H10 de rata como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4. Los ratones se analizaron para determinar los cambios de DMO mediante pQCT y microCT (µCT). Para µCT, se examinaron arquitectura trabecular y la geometría cortical en los fémures de ratón utilizando un eXplore Locus SP Micro-CT System (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA). Los fémures se colocaron en crio-tubos de 2 ml con un fantasma de densidad ósea, cargados con PBS, y se estabilizaron con una gasa. Los fémures completos se escanearon a rotaciones 0,5° durante 200° (80 kVp, 80 uA) calibrados con el fantasma de densidad y se reconstruyeron para producir imágenes con un tamaño de voxel de 18 x 18 x 18 µm.

Las regiones de interés se analizaron para determinar los parámetros morfométricos y de densidad corticales y trabeculares (programa GEHC MicroView). El 10% central (en longitud) de la diáfisis del fémur se analizó para determinar los perímetros medios del endostio y el periostio, así como de la zona cortical y la DMO volumétrica (umbral = 640 mg/cc). Las regiones de hueso trabecular del fémur distal se aislaron y se analizaron para determinar la DMO y los parámetros de estereología, incluyendo la fracción volumétrica del hueso (BV/TV), el espesor trabecular (Tb.Th), el número trabecular (Tb.N), y la DMO volumétrica (umbral = 320 mg/cc). Estas regiones se seleccionaron basándose en la longitud del fémur (10% de la longitud) y se situaron próximas a la esponjosa de la placa de crecimiento.

Tanto pQCT como µCT mostraron cambios significativos en la DMO en ratones jóvenes y viejos tratados con 11H10 de rata. Además, µCT permitió demostrar que la actividad neutralizadora de Dkk1 con 11H10 de rata conducía a aumentos significativos en el número trabecular en ratones tanto jóvenes como viejos (Figura 2). La dosis más alta de 11H10 de rata en los ratones viejos dio como resultado en una disminución en el perímetro del endostio, lo que indica que 11H10 de rata también afectaba positivamente al crecimiento del hueso cortical, además del hueso esponjoso.

Para determinar si la neutralización de Dkk1 podía ayudar a restaurar la pérdida de hueso debida a la falta de estrógenos, se trataron ratones ovariectomizados (OVX) con 11H10 de rata (3, 10, 30 mg/kg dos veces por semana mediante inyección subcutánea). En el experimento se trataron ratones CDF-1 de 7 meses de edad, 5 meses después de la OVX, con 11H10 de rata, PTH (100 mg/kg) o vehículo. La DMO se analizó mediante pQCT en el período inicial, el día 7, 14, 21 y 28. Los datos del día 28 se muestran a continuación como el porcentaje de cambio desde el momento inicial para la tibia y las vértebras lumbares (Figura 3).

En un experimento separado, se determinó la eficacia del isotipo h11H10 RT IgG1 y el isotipo h11H10 RT IgG2 (véanse las Tablas 1 y 2 para las secuencias de las cadenas ligeras y pesadas y las regiones variables) en ratones jóvenes utilizando un protocolo similar al descrito anteriormente con la modificación de que se compararon el isotipo h11H10 RT IgG1 y el isotipo h11H10 RT IgG2 con 11H10 de rata y PTH (Figura 4). Los datos indican que estos dos anticuerpos también aumentaron la DMO, según se determinó mediante análisis DEXA, en ratones.

Los resultados de los experimentos descritos anteriormente indican que la neutralización de la actividad de Dkk-1 con algunos de los anticuerpos descritos en la presente memoria tiene un efecto anabólico sobre la formación de hueso.

Ejemplo 6

Caracterización de epítomos de Dkk-1 humana que se unen al anticuerpo 11H10

La Dkk-1 humana contiene dos dominios ricos en disulfuro situados cerca del extremo N y cerca del final del extremo C, referidos aquí como dominios disulfuro N- y C-terminales. El dominio disulfuro N-terminal (referido más adelante "dominio disulfuro 1") contiene 55 residuos de aminoácidos (aminoácidos 85-139 del SEC ID NO: 2) y tiene 10 cisteínas que forman enlaces 5 disulfuro intramoleculares. El dominio disulfuro C-terminal (referido más adelante "dominio disulfuro 2") contiene aproximadamente 75 aminoácidos (aminoácidos 189 a 263 del SEC ID NO: 2) y contiene 10 cisteínas que forman 5 puentes disulfuro intramoleculares, que dan como resultado la formación de siete bucles en la proteína completamente plegada (véase la Figura 1). Se ha propuesto que el dominio disulfuro 2 de Dkk-1 tiene una estructura molecular similar al plegamiento de la colipasa canónica, cuya estructura cristalina ha sido determinada utilizando colipasa porcina (Aravind, A. y Koonin, E.V., *Current Biology* 8: R477-479 (1998)). Los siete bucles del dominio disulfuro 2 de la Dkk-1 humana consisten de los aminoácidos 190-194, 196-199, 202-209, 211-219, 221-236, 240-244 y 246-262 del SEC ID NO: 2.

El tratamiento con un agente reductor anuló la capacidad de Dkk-1 para unirse a 11H10, lo que indica que el epítipo elegido como diana por este anticuerpo era conformacional y requería el mantenimiento de al menos algunos de los enlaces disulfuro de esta proteína. Para caracterizar este epítipo conformacional, se aplicó una estrategia que implicaba fragmentar Dkk-1 humana con bromuro de cianógeno (CNBr) y varias proteasas diferentes, a continuación, sometiendo a ensayo después los fragmentos resultantes para ver si todavía se podían unir al anticuerpo 11H10. Los datos resultantes permitieron determinar la localización del epítipo. En resumen, se incubaron los productos digeridos del péptido con o sin el anticuerpo, se hicieron pasar a través de una membrana de corte 10 K para atrapar cualquiera de los péptidos que se habían unido al anticuerpo (~ 150.000 Da), después se sometió a mapeo de péptidos mediante HPLC. Una reducción de la altura de un pico de la HPLC en una muestra expuesta a anticuerpo indicó que los péptidos de ese pico se habían unido al anticuerpo y por lo tanto formaban parte del epítipo. Se recogieron los picos de la HPLC individuales y los péptidos se identificaron y mapearon mediante secuenciación N-terminal. Para determinar si los péptidos se podrían unir a 11H10, se sometieron a análisis de interacción biospecífica en tiempo real con una estación de trabajo BiaCore, utilizando anticuerpo anti-Dkk-1 atrapado con Proteína A como biosensor para la unión.

Todos los análisis de HPLC para estos estudios se llevaron a cabo utilizando una columna C5 de fase inversa (1 mm d.i. x 10 cm de longitud). El mapeo del péptidos por HPLC se realizó con un gradiente lineal de ácido trifluoroacético al 0,05% (fase móvil A) a acetonitrilo al 90% en ácido trifluoroacético al 0,05%. Las columnas se desarrollaron durante 70 minutos a una velocidad de flujo de 0,15 ml/min.

Digestión CNBr

La escisión con CNBr de hDkk-1 generó dos fragmentos grandes, CNBr1 y CNBr2. Estos representaron, respectivamente, el dominio disulfuro 2 y el dominio disulfuro 1. CNBr1 consistió en dos péptidos (aminoácidos 179-206 del SEC ID NO: 2 y aminoácidos 207 a 266 del SEC ID NO: 2) mantenidos unidos mediante enlaces disulfuro. CNBr2 consistió de un modo similar en dos péptidos (aminoácidos 32-122 del SEC ID NO: 2 y aminoácidos 127 a 178 del SEC ID NO: 2), también mantenidos unidos mediante enlaces disulfuro. Los resultados del análisis BiaCore indicaron que 11H10 era capaz de unirse de manera significativa a CNBr1, pero no se unía en absoluto a CNBr2. De este modo, se concluyó que 11H10 se une a un epítipo localizado en el dominio disulfuro 2 de Dkk-1.

Digestión con tripsina

La Dkk-1 humana se digirió a continuación con tripsina, que escinde después de Arg y Lys. Se incubaron aproximadamente 200 µg de Dkk-1 a 0,5-1,0 mg/ml en PBS (pH 7,2) durante 20 horas a 37°C con 8 µg de una u otra de estas proteasas para lograr una digestión completa de la Dkk-1.

La cromatografía HPLC de los productos digeridos con tripsina produjo múltiples picos. Para determinar cual, si lo hubiera, de los fragmentos tripticos conservaba la capacidad de unirse al anticuerpo, el producto de la digestión se incubó con el anticuerpo 11H10 a una razón molar 1:2 a 0°C durante 2 horas. El anticuerpos y cualquiera de los péptidos unidos a él se capturaron sobre una membrana Microcon (peso molecular de corte 30000). Los péptidos en el flujo directo del filtro Microcon se analizaron mediante HPLC para determinar qué picos se reducían o eliminaban debido a haberse unido al anticuerpo. Los resultados de la HPLC para las muestras expuestas a anticuerpo se compararon con productos digeridos de control que se habían sometido a los mismos procedimientos sin 11H10. Como se comenta más abajo, ninguno de los fragmentos generados mediante la digestión con tripsina conservó la capacidad de unirse 11H10.

El análisis de la secuencia se llevó a cabo para identificar y mapear los péptidos en los picos recuperados de la HPLC después de la digestión con tripsina. Se confirmó que dos picos, Tryp40.5 (tiempo de retención 40,5 minutos) (~ 6-7 kDa) y Tryp45 (~8 kDa), contenían secuencias que mapeaban, respectivamente, el dominio disulfuro 2 y el dominio disulfuro 1. Ni Tryp40.5 ni Tryp45 se unieron a 11H10 cuando se sometieron a ensayo mediante la captura con la membrana Microcon o mediante experimentos de unión BiaCore. Tryp40.5 consistió en siete péptidos pequeños (6 a 12 aminoácidos de longitud) mantenidos juntos por los cinco enlaces de disulfuro de dominio disulfuro 2. Tres segmentos pequeños de la secuencia del dominio disulfuro 2 faltaban de Tryp40.5. Estas secuencias perdidas fueron los aminoácidos 204-208, 223-226 y 247-249 del SEC ID NO: 2). Puesto que Tryp40.5 no se puede

unir a 11H10, parece que uno o más de estos tres péptidos perdidos deben formar una parte esencial del epítipo al que se une este anticuerpo.

Digestión con Endo Lys C

La digestión de Dkk-1 humana con Endo LysC (escinde solo después de lys) también generó varios picos cuando se sometió a HPLC como se ha descrito anteriormente. Solo una fracción de HPLC, LysC48.7, mostró una reducción en la altura del pico cuando el producto de digestión se incubó con el anticuerpo antes del análisis mediante HPLC. LysC48.7 consistió en tres fragmentos peptídicos mantenidos juntos por los cinco enlaces disulfuro del dominio disulfuro 2. El análisis de la secuencia indicó que estos tres péptidos consistían en los aminoácidos 183-222, 227-249, y 250-266 del SEC ID NO: 2. El análisis de la secuencia reveló que LysC48.7 carecían solo de un segmento del dominio disulfuro 2, a saber, un péptido localizado en los aminoácidos 223-226 del SEC ID NO: 2. De este modo, LysC48.7 estaba estructuralmente más intacto que Tryp40.8, que carecía de los tres segmentos del dominio disulfuro 2.

La capacidad de 11H10 para unir las fracciones LysC se determinó usando el análisis de unión BIAcore. Solo la fracción LysC48.7 mostró alguna actividad de unión. La fracción LysC48.7 mostró una fuerte tasa de asociación de unión al anticuerpo. Sin embargo, la tasa de disociación fue muy rápida disminuyendo rápidamente la unión a los niveles de fondo. Estos datos indican que el epítipo diana para 11H10 no conservará la unión al anticuerpo cuando los aminoácidos 223-226 del SEC ID NO: 2 se recorten del dominio disulfuro 2. Por lo tanto, se concluyó que los residuos 223 a 226 pueden entrar en contacto directo con 11H10 cuando éste se une a Dkk-1 o que estos residuos son esenciales para mantener la estructura tridimensional que permite que el anticuerpo entre en contacto eficazmente otros residuos de aminoácidos en la inmediatas proximidades de los aminoácidos 223-226 de la proteína plegada.

Digestión con ASPN

Para definir con mayor precisión el epítipo de unión a 11H10, se digirió hDkk-1 con la proteasa ASPN y los fragmentos resultantes se analizaron como se ha descrito anteriormente. De los principales picos de la HPLC generados mediante digestión con ASPN, tres se redujeron en altura si el producto digerido se había expuesto previamente a 11H10, lo que indica que estos péptidos se habían unido al anticuerpo. Los picos que se unieron al anticuerpos fueron AspN48.7, AspN49.6 y AspN52. El análisis de secuencia indicó que estos tres picos reactivos con el anticuerpo derivaban del dominio disulfuro 2. AspN48.7 y AspN49.6 tenían una secuencia de aminoácidos idéntica y cada uno de ellos consistía en dos péptidos mantenidos juntos por los cinco enlaces disulfuro en el dominio disulfuro 2. La diferencia en la migración en la HPLC de estos dos picos se debió probablemente a la heterogeneidad de los radicales carbohidrato anclados a Asn₂₅₆. Estos dos péptidos consistían en los aminoácidos 166 a 231 y 232 a 266 del SEC ID NO: 2. AspN52 contenía solo un único péptido, correspondiente a los aminoácidos 166-266 del SEC ID NO: 2. De este modo, AspN52 es evidentemente un producto de digestión parcial cuya secuencia se solapa en gran medida con AspN48.7 y 49.6, aunque los dos últimos recibieron un recorte adicional entre Leu₂₃₁ y Glu₂₃₂ con respecto a AspN52. Este recorte se produce en el bucle que se encuentra entre los aminoácidos 221 y 236 del SEC ID NO: 2. Estos tres picos mostraron una unión significativa a 11H10 en los experimentos de captura Microcon y en el análisis de unión de BIAcore. Estos datos indican que la interrupción del enlace peptídico entre los aminoácidos 231 y 232 de hDkk-1 (SEC ID NO: 2) no afecta a la capacidad de 11H10 para reconocer su epítipo diana.

Análisis de los resultados de la digestión

Los resultados anteriores indican que 11H10 se une a un epítipo no lineal de Dkk-1 humana localizado en el dominio disulfuro 2 de la proteína, y que el epítipo reside en los dos bucles grandes formados por enlaces disulfuro Cys₂₂₀-Cys₂₄₅, Cys₂₃₉-Cys₂₆₃ y Cys₂₀₀-Cys₂₃₇ del SEC ID NO: 2 (véase la Figura 1). Como se ilustra en la Figura 1, los dos bucles que forman el epítipo se encuentran entre Cys₂₂₀ y Cys₂₃₇ y entre Cys₂₄₅ y Cys₂₆₃, comprendiendo el cuerpo de los dos bucles por lo tanto los aminoácidos 221-236 y 246-262 del SEC ID NO: 2. La digestión con tripsina de Dkk-1 abrió los bucles Cys₂₂₀/Cys₂₃₇ y Cys₂₄₅/Cys₂₆₃ mediante la eliminación de los aminoácidos 223-226 y 247-249. Con estos dos péptidos eliminados, los productos de la digestión con tripsina no se pudieron unir a 11H10. Un tercer péptido (aminoácidos 204-208 del SEC ID NO: 2) también fue suprimido mediante la digestión con tripsina, pero se consideró que se encontraba fuera del epítipo porque las otras proteasas fueron capaces de reducir la unión del anticuerpo sin cortar el bucle en el que residen estos aminoácidos. La digestión con LysC, que redujo drásticamente la unión al anticuerpo, también abrió el bucle Cys₂₂₀/Cys₂₃₇ mediante la eliminación de los aminoácidos 223-226 del SEC ID NO: 2 y el bucle Cys₂₄₅/Cys₂₆₃ mediante la escisión de un solo enlace peptídico en Lys₂₄₉ (SEC ID NO: 2). De este modo, los resultados de la digestión con LysC implicaron de nuevo los bucles Cys₂₂₀/Cys₂₃₇ y Cys₂₄₅/Cys₂₆₃ en la unión a 11H10. La digestión AspN cortó en Glu₂₃₂ (SEC ID NO: 2) en el bucle Cys₂₂₀/Cys₂₃₇ sin reducir la unión del anticuerpo, lo que sugiere que la conservación de la conformación adecuada del epítipo no requería este bucle de estar absolutamente intacta. Sin embargo, este bucle es claramente importante porque, como se muestra arriba, la eliminación de los aminoácidos 223-226 del SEC ID NO: 2 por LysC de este mismo bucle destruyó la unión del anticuerpo.

De acuerdo con estos análisis, el epítipo que se une a 11H10 está localizado en las proximidades de los bucles Cys₂₂₀/Cys₂₃₇ y Cys₂₄₅/Cys₂₆₃ en el dominio disulfuro 2, por lo tanto, los aminoácidos 220-237 y los aminoácidos 245-263 del SEC ID NO: 2 son muy importantes para la unión del anticuerpo. Los bucles formados por los otros enlaces disulfuro de este agrupamiento de disulfuros en el dominio C-terminal no parecían estar implicados en el reconocimiento por este anticuerpo. Los resultados muestran también que los enlaces disulfuro de este dominio deben estar intactos para mantener el epítipo en una configuración que permita la unión del anticuerpo. Dentro del epítipo, las porciones mínimas que parecerían necesarias para conservar la unión incluirían los aminoácidos 221-229 del SEC ID NO: 2 (esto deriva del hecho de que la escisión en Glu₂₃₂ no tuvo ningún efecto sobre la unión) y los aminoácidos 246-253 del SEC ID NO: 2, como consideraciones estructurales indican que Asn₂₅₆ está conectada a grupos carbohidrato voluminosos que pueden ocultar los otros aminoácidos de este bucle de cara a la unión a 11H10.

Ejemplo 7

El anticuerpo 1F11 compete con 11H10 por la unión a Dkk-1

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si el anticuerpo monoclonal 1F11 se podría unir al mismo epítipo en Dkk-1 que 11H10. Este asunto tenía interés debido a que estos anticuerpos monoclonales neutralizan la actividad biológica de Dkk-1. Como se muestra en la Tabla 12 a continuación, 1F11 neutraliza la actividad Dkk-1 de ratón, rata y humana en el análisis TCF-lef, aunque no tan bien como 11H10.

Tabla 12

CE50 (nM)			
Anticuerpo (200 ng/ml)	Dkk-1 de ratón	Dkk-1 de rata	Dkk-1 humana
11H10	11,5	5,0	4,0
1F11	62,6	21,2	19,5

Los experimentos de competición entre 11H10 y 1F11 se llevaron a cabo utilizando BIAcore 2000, como se describió anteriormente. Se utilizaron chips BIAcore sobre los cuales se habían inmovilizado 11H10 o 1F11 para capturar Dkk-1 humana. Después de la etapa de captura, se inyectaron 1F11 o 11H10 sobre las superficies de los chips para ver si se podía lograr una unión adicional a Dkk-1. En estos experimentos, ninguno de los anticuerpos inyectado sobre los chips fue capaz de unirse a la Dkk-1 humana capturada, es decir, 11H10 no fue capaz de unirse a Dkk-1 humano que había sido capturada por 1F11, ni 1F11 pudo unirse a Dkk-1 humana que había sido capturada por 11H10. Estos datos indican claramente que estos dos anticuerpos se unen al mismo epítipo en Dkk-1 humana, lo que sugiere que la elección como diana de este epítipo concreto es un método particularmente eficaz para neutralizar la actividad de Dkk-1.

Se llevaron a cabo otros experimentos para determinar si algunos de los otros anticuerpos, que incluían las cadenas pesadas y ligeras que figuran en la Tabla 1 (pares idénticos de cadenas pesadas y ligeras) podían competir por el mismo epítipo reconocido por 11H10 y 1F11 de rata y se encontró que lo hacían.

Ejemplo 8

11h10 bloquea la unión de Dkk-1 a LRP6

Para determinar si 11H10 estaba ejerciendo su efecto biológico al interferir con la interacción de Dkk-1 y LRP6, y por inferencia LRP5, se estableció un análisis de unión de Dkk-1 a LRP6 utilizando citometría de flujo. Este análisis utiliza una proteína de fusión LRP6-Fc obtenida comercialmente (R & D Systems, Núm. 1505-LR) y una Dkk-1 humana etiquetada con biotina amino-terminal. El constructo de fusión de Dkk-1 etiquetada con biotina se generó mediante clonación de ADN que codificaba hDkk-1, de modo que fuera expresada fusionada al extremo C de la biotina en un constructo de expresión de mamífero. Este constructo se transfectó de transitoriamente a células 293T y el medio acondicionado se recogió 48 horas después de la transfección.

Para determinar si 11H10 era capaz de interferir en la unión de Dkk-1 a LRP6, se añadió LRP6 al medio acondicionado con y sin 11H10. Después se añadieron cuentas de estreptavidina a esta preparación, lo que permitió la unión de la proteína de fusión de biotina Dkk1 a las cuentas. La unión de LRP6 a Dkk-1 se determinó mediante el uso de un anticuerpo conjugado con FITC específico para la porción Fc del constructo de fusión LRP6-Fc. La unión de LRP6 a Dkk-1 se detectó mediante el uso de citometría de flujo. Se detectó una señal de unión específica (la unión específica es igual a la señal total observada menos la señal observada en ausencia de Dkk-1) de 6,46 con LRP6 y Dkk-1. La incubación de Dkk-1 con 11H10 antes de la adición de LRP6 redujo esta señal a 2,66, que fue inferior al 50% de la unión específica observada sin el anticuerpo, lo que indica que 11H10 interfiere en la unión de Dkk-1 a LRP6.

Ejemplo 9

Clonación de los ADNc de la cadena pesada y ligera de 11H10

El ARN total se aisló de células de hibridoma de rata 11H10 con reactivo TRIzol® (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, después se purificó adicionalmente usando una columna Qiagen RNeasy®. Se ligó un oligonucleótido 5' RACE (del inglés "Rapid Amplification of cDNA Ends" amplificación rápida de extremos de ADNc) (5'-CGA CUG GAG CAC GAG GAC ACU GAC AUG GAC UGA AGG AGU AGA AA-3', SEC ID NO: 15) al ARN utilizando los componentes y de protocolo del kit GeneRacer™ (Invitrogen). Este oligonucleótido proporciona dos sitios de cebado únicos en los extremos 5' de las moléculas de ARNm. El ADNc de la primera cadena se sintetizó a partir de este ARN modificado utilizando un cebador al azar con un adaptador de extensión (5'-GGC CGG ATA GGC CTC ACN NNN NNT-3'; SEC ID NO: 16).

Tomando ventaja de las secuencias conservadas en los genes de anticuerpos de rata, se llevaron a cabo reacciones de PCR con 5' RACE para amplificar los ADNc que codificaban el anticuerpo anti- μ Dkk-1. Para clonar la cadena ligera completa de 11H10, se realizó una PCR con RACE usando el cebador 5' GeneRacer™ (5' CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3', SEC ID NO: 17) como cebador directo, y utilizando 5'-GCA ACA GTG GTA GGT CGC TTG TGG-3' (SEC ID NO: 18) como cebador inverso. Este cebador inverso corresponde a los nucleótidos 74-98 en la región no traducida 3' de la cadena kappa de la rata. Este producto de PCR se utilizó después como molde para una PCR anidada utilizando el cebador anidado 5' GeneRacer™ (5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA-3' (SEC ID NO: 19)) como cebador directo y el mismo cebador inverso (SEC ID NO: 18).

La PCR RACE para la región variable de las cadenas pesadas utilizó el cebador GeneRacer™ como cebador directo y como cebador inverso utilizó 5'-AGG AGC CAG TGG ATA GAC AGA-3' (SEC ID NO: 20) que corresponde a los nucleótidos diecinueve a treinta y nueve de la región constante de IgG de rata. Este producto de PCR se utilizó después como molde para una PCR anidada utilizando el cebador anidado 5' GeneRacer™ como cebador directo y el mismo cebador inverso 5'-AGG AGC CAG TGG ATA GAC AGA-3' (SEC ID NO: 20).

Los productos de la PCR RACE se clonaron después en el vector de clonación pCR4-TOPO TA (Invitrogen). Las secuencias de ADN de estos clones se determinaron utilizando cebadores del vector pCR4 que flanqueaban el sitio de clonación, nucleótidos marcados con colorante y secuenciadores de ADN ABI. Secuencias consenso para las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada 11H10 se ensamblaron y se utilizaron para diseñar cebadores de PCR 5' dirigidos a los extremos amino terminales de las secuencias codificantes. Estos cebadores también contenían un sitio de restricción Sall para la clonación y una secuencia Kozak. El cebador de PCR 5' diseñado para la cadena ligera tenía la siguiente secuencia de nucleótidos: 5'-AAG CTC GAG GTC GAC TAG ACC ACC ATG GGT GTG CCT ACT CAT CTC-3' (SEC ID NO: 21); para la cadena pesada, 5'-AAG CTC GAG GTC GAC TAG ACC ACC ATG GAC ATC AGG CTC AGC TTG G 3' (SEC ID NO: 22). Estos cebadores 5' se utilizaron después con los cebadores 3' dirigidos a los extremos carboxi terminales de las secuencias codificantes y que contenían un sitio de restricción NotI para la clonación. El cebador 3' para la cadena ligera tenía la siguiente secuencia de nucleótidos: 5'-AAC CGT TTA AAC GCG GCC GCC TAA CAC TCA TTC CTG TTG A-3' (SEC ID NO: 23), y el cebador 3' para la cadena pesada, 5'-AAC CGT TTA AAC GCG GCC GCT CAT TTA CCC GGA GAG TGG GAG-3' (SEC ID NO: 24). Estos cebadores se usaron en reacciones de PCR para amplificar las regiones codificantes completas de los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo 11H10. Las secuencias clonadas se expresaron en células CHO como describen Bianchi y McGrew, 2003.

Las secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas ligera y pesada completas de 11H10 se muestran en los SEC ID NOS: 9 y 11, respectivamente, y los SEC ID NOS: 10 y 12 representan las secuencias de aminoácidos. La cadena ligera de 11H10 tiene una secuencia líder que consiste en los aminoácidos 1-20 (codificados por los nucleótidos 1-60 del SEC ID NO: 9), de este modo la proteína madura comienza en el aminoácido 21 del SEC ID NO: 10. La región variable de la cadena ligera de 11H10 está codificada por los nucleótidos 61-381 del SEC ID NO: 9 (véase también el SEC ID NO: 83), que corresponde a los aminoácidos 21-127 del SEC ID NO: 10 (véase, también el SEC ID NO: 84). La CDR1 de la cadena ligera de 11H10 está codificada por los nucleótidos 130-162 de la SEC ID NO: 9 (véase también el SEC ID NO: 85), que codifica los aminoácidos 44-54 del SEC ID NO: 10 (véase también el SEC ID NO: 70); la CDR2 de la cadena ligera de 11H10 son los residuos codificados por 208-228 del SEC ID NO: 9 (véase también el SEC ID NO: 86), que codifica los aminoácidos 70-76 del SEC ID NO: 10 (véase también el SEC ID NO: 72); y la CDR3 de 11H10 está codificada por los nucleótidos 325-351 del SEC ID NO: 9 (véase también el SEC ID NO: 87), que codifica los aminoácidos 109-117 del SEC ID NO: 10 (véase también el SEC ID NO: 74).

La cadena pesada 11H10 tiene una secuencia líder que consiste en los aminoácidos 1-19 (codificada por los nucleótidos 1-57 del SEC ID NO: 11), de este modo la proteína madura comienza en el residuo 20 del SEC ID NO: 12 y está codificada por los nucleótidos 58-1395. La región variable de la cadena pesada está codificada por los nucleótidos 58-417 del SEC ID NO: 11 (véase también el SEC ID NO: 90), que codifica los aminoácidos 20-139 del SEC ID NO: 12 (véase también el SEC ID NO: 91). La CDR1 de la cadena pesada está codificada por los nucleótidos 148-162 del SEC ID NO: 11 (véase también el SEC ID NO: 92), que codifica los aminoácidos 50-54 del SEC ID NO: 12 (véase también SEC ID NO: 76); la CDR2 de la cadena pesada 11H10 está codificada por los nucleótidos 205-255 del SEC ID NO: 11 (véase también el SEC ID NO: 93), que codifica los aminoácidos 69-85 del SEC ID NO: 11 (véase también el SEC ID NO: 78); y la CDR3 de la cadena pesada de 11H10 está codificada por los nucleótidos 352-384 del SEC ID NO: 11 (véase también el SEC ID NO: 94), que codifica los aminoácidos 118-128 del SEC ID NO: 12 (véase también el SEC ID NO: 80).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.
 LI, Ji
 LU, Hsieng Sen
 5 SHEN, Wenyan
 RICHARDS, William

<120> Anticuerpos para DKK-1.

<130> A-941(WO)

<140> --para ser asignado --
 10 <141> 04-08-2005

<150> US 60/598,791
 <151> 04-08-2004

<160> 94

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
 <211> 801
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(801)

<400> 1

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

ES 2 414 460 T3

Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala Met Cys Cys	
115 120 125	
ccc ggg aat tac tgc aaa aat gga ata tgt gtg tct tct gat caa aat	432
Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Val Ser Ser Asp Gln Asn	
130 135 140	
cat ttc cga gga gaa att gag gaa acc atc act gaa agc ttt ggt aat	480
His Phe Arg Gly Glu Ile Glu Glu Thr Ile Thr Glu Ser Phe Gly Asn	
145 150 155 160	
gat cat agc acc ttg gat ggg tat tcc aga aga acc acc ttg tct tca	528
Asp His Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Leu Ser Ser	
165 170 175	
aaa atg tat cac acc aaa gga caa gaa ggt tct gtt tgt ctc cgg tca	576
Lys Met Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val Cys Leu Arg Ser	
180 185 190	
tca gac tgt gcc tca gga ttg tgt tgt gct aga cac ttc tgg tcc aag	624
Ser Asp Cys Ala Ser Gly Leu Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Ser Lys	
195 200 205	
atc tgt aaa cct gtc ctg aaa gaa ggt caa gtg tgt acc, aag cat agg	672
Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys Thr Lys His Arg	
210 215 220	
aga aaa ggc tct cat gga cta gaa ata ttc cag cgt tgt tac tgt gga	720
Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Tyr Cys Gly	
225 230 235 240	
gaa ggt ctg tct tgc cgg ata cag aaa gat cac cat caa gcc agt aat	768
Glu Gly Leu Ser Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His Gln Ala Ser Asn	
245 250 255	
tct tct agg ctt cac act tgt cag aga cac taa	801
Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His	
260 265	

<210> 2
 <211> 266
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

ES 2 414 460 T3

Gly Ile Leu Tyr Pro Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Ile Asp Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Thr Asp Glu Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Pro Thr Arg Gly Gly Asp Ala Gly Val Gln Ile Cys Leu
100 105 110

Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala Met Cys Cys
115 120 125

Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Val Ser Ser Asp Gln Asn
130 135 140

His Phe Arg Gly Glu Ile Glu Glu Thr Ile Thr Glu Ser Phe Gly Asn
145 150 155 160

Asp His Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Leu Ser Ser
165 170 175

Lys Met Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val Cys Leu Arg Ser
180 185 190

Ser Asp Cys Ala Ser Gly Leu Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Ser Lys
195 200 205

Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys Thr Lys His Arg
210 215 220

Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Tyr Cys Gly
225 230 235 240

Glu Gly Leu Ser Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His Gln Ala Ser Asn
245 250 255

Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His
260 265

<210> 3
<211> 819
<212> ADN
<213> Ratón

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(819)

<400> 3

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Val Cys Thr Lys His Lys Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe
 225 230 235 240

cag cgc tgt tac tgc ggg gaa ggc ctg gct tgc agg ata cag aaa gat 768
 Gln Arg Cys Tyr Cys Gly Glu Gly Leu Ala Cys Arg Ile Gln Lys Asp
 245 250 255

cac cat caa gcc agc aat tct tct agg ctc cac acc tgc cag aga cac 816
 His His Gln Ala Ser Asn Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His
 260 265 270

taa 819

<210> 4
 <211> 272
 <212> PRT
 5 <213> Ratón

<400> 4

Met Met Val Val Cys Ala Pro Ala Ala Val Arg Phe Leu Ala Val Phe
 1 5 10 15

Thr Met Met Ala Leu Cys Ser Leu Pro Leu Leu Gly Ala Ser Ala Thr
 20 25 30

Leu Asn Ser Val Leu Ile Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro
 35 40 45

Pro Leu Gly Gly Ala Gly Gly Gln Pro Gly Ser Ala Val Ser Val Ala
 50 55 60

Pro Gly Val Leu Tyr Glu Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Leu Asp Asn
 65 70 75 80

Tyr Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Ser Asp Glu
 85 90 95

Tyr Cys Ser Ser Pro Ser Arg Gly Ala Ala Gly Val Gly Gly Val Gln
 100 105 110

Ile Cys Leu Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Thr His Ala
 115 120 125

Met Cys Cys Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Met Pro Ser
 130 135 140

Asp His Ser His Phe Pro Arg Gly Glu Ile Glu Glu Ser Ile Ile Glu
 145 150 155 160

ES 2 414 460 T3

Asn Leu Gly Asn Asp His Asn Ala Ala Ala Gly Asp Gly Tyr Pro Arg
165 170 175

Arg Thr Thr Leu Thr Ser Lys Ile Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly
180 185 190

Ser Val Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ala Ala Gly Leu Cys Cys Ala
195 200 205

Arg His Phe Trp Ser Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln
210 215 220

Val Cys Thr Lys His Lys Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe
225 230 235 240

Gln Arg Cys Tyr Cys Gly Glu Gly Leu Ala Cys Arg Ile Gln Lys Asp
245 250 255

His His Gln Ala Ser Asn Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His
260 265 270

<210> 5
<211> 4848
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(4848)

<400> 5

atg gag gca gcg ccg ccc ggg ccg ccg tgg ccg ctg ctg ctg ctg ctg 48
Met Glu Ala Ala Pro Pro Gly Pro Pro Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

ctg ctg ctg ctg gcg ctg tgc ggc tgc ccg gcc ccc gcc gcg gcc tcg 96
Leu Leu Leu Leu Ala Leu Cys Gly Cys Pro Ala Pro Ala Ala Ala Ser
20 25 30

ccg ctc ctg cta ttt gcc aac cgc cgg gac gta cgg ctg gtg gac gcc 144
Pro Leu Leu Leu Phe Ala Asn Arg Arg Asp Val Arg Leu Val Asp Ala
35 40 45

ggc gga gtc aag ctg gag tcc acc atc gtg gtc agc gcc ctg gag gat 192
Gly Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Ile Val Val Ser Gly Leu Glu Asp
50 55 60

gcg gcc gca gtg gac ttc cag ttt tcc aag gga gcc gtg tac tgg aca 240
Ala Ala Ala Val Asp Phe Gln Phe Ser Lys Gly Ala Val Tyr Trp Thr
65 70 75 80

10 gac gtg agc gag gag gcc atc aag cag acc tac ctg aac cag acg ggg 288

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Cys	Ala	Cys	Pro	Thr	Gly	Val	Gln	Leu	Gln	Asp	Asn	Gly	Arg	Thr	Cys	
				325					330					335		
aag	gca	gga	gcc	gag	gag	gtg	ctg	ctg	ctg	gcc	cgg	cgg	acg	gac	cta	1056
Lys	Ala	Gly	Ala	Glu	Glu	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Arg	Thr	Asp	Leu	
			340					345					350			
cgg	agg	atc	tcg	ctg	gac	acg	ccg	gac	ttt	acc	gac	atc	gtg	ctg	cag	1104
Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Asp	Thr	Pro	Asp	Phe	Thr	Asp	Ile	Val	Leu	Gln	
		355					360					365				
gtg	gac	gac	atc	cgg	cac	gcc	att	gcc	atc	gac	tac	gac	ccg	cta	gag	1152
Val	Asp	Asp	Ile	Arg	His	Ala	Ile	Ala	Ile	Asp	Tyr	Asp	Pro	Leu	Glu	
	370					375				380						
ggc	tat	gtc	tac	tgg	aca	gat	gac	gag	gtg	cgg	gcc	atc	cgc	agg	gcg	1200
Gly	Tyr	Val	Tyr	Trp	Thr	Asp	Asp	Glu	Val	Arg	Ala	Ile	Arg	Arg	Ala	
385					390					395					400	
tac	ctg	gac	ggg	tct	ggg	gcg	cag	acg	ctg	gtc	aac	acc	gag	atc	aac	1248
Tyr	Leu	Asp	Gly	Ser	Gly	Ala	Gln	Thr	Leu	Val	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	
			405						410				415			
gac	ccc	gat	ggc	atc	gcg	gtc	gac	tgg	gtg	gcc	cga	aac	ctc	tac	tgg	1296
Asp	Pro	Asp	Gly	Ile	Ala	Val	Asp	Trp	Val	Ala	Arg	Asn	Leu	Tyr	Trp	
			420					425					430			
acc	gac	acg	ggc	acg	gac	cgc	atc	gag	gtg	acg	cgc	ctc	aac	ggc	acc	1344
Thr	Asp	Thr	Gly	Thr	Asp	Arg	Ile	Glu	Val	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly	Thr	
			435				440					445				
tcc	cgc	aag	atc	ctg	gtg	tcg	gag	gac	ctg	gac	gag	ccc	cga	gcc	atc	1392
Ser	Arg	Lys	Ile	Leu	Val	Ser	Glu	Asp	Leu	Asp	Glu	Pro	Arg	Ala	Ile	
	450					455					460					
gca	ctg	cac	ccc	gtg	atg	ggc	ctc	atg	tac	tgg	aca	gac	tgg	gga	gag	1440
Ala	Leu	His	Pro	Val	Met	Gly	Leu	Met	Tyr	Trp	Thr	Asp	Trp	Gly	Glu	
465					470					475					480	
aac	cct	aaa	atc	gag	tgt	gcc	aac	ttg	gat	ggg	cag	gag	cgg	cgt	gtg	1488
Asn	Pro	Lys	Ile	Glu	Cys	Ala	Asn	Leu	Asp	Gly	Gln	Glu	Arg	Arg	Val	
			485						490					495		
ctg	gtc	aat	gcc	tcc	ctc	ggg	tgg	ccc	aac	ggc	ctg	gcc	ctg	gac	ctg	1536
Leu	Val	Asn	Ala	Ser	Leu	Gly	Trp	Pro	Asn	Gly	Leu	Ala	Leu	Asp	Leu	
			500					505					510			
cag	gag	ggg	aag	ctc	tac	tgg	gga	gac	gcc	aag	aca	gac	aag	atc	gag	1584
Gln	Glu	Gly	Lys	Leu	Tyr	Trp	Gly	Asp	Ala	Lys	Thr	Asp	Lys	Ile	Glu	
		515					520					525				
gtg	atc	aat	gtt	gat	ggg	acg	aag	agg	cgg	acc	ctc	ctg	gag	gac	aag	1632
Val	Ile	Asn	Val	Asp	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Thr	Leu	Leu	Glu	Asp	Lys	
	530					535					540					
ctc	ccg	cac	att	ttc	ggg	ttc	acg	ctg	ctg	ggg	gac	ttc	atc	tac	tgg	1680
Leu	Pro	His	Ile	Phe	Gly	Phe	Thr	Leu	Leu	Gly	Asp	Phe	Ile	Tyr	Trp	
545					550					555					560	
act	gac	tgg	cag	cgc	cgc	agc	atc	gag	cgg	gtg	cac	aag	gtc	aag	gcc	1728

ES 2 414 460 T3

Thr	Asp	Trp	Gln	Arg	Arg	Ser	Ile	Glu	Arg	Val	His	Lys	Val	Lys	Ala		
				565					570						575		
agc	cgg	gac	gtc	atc	att	gac	cag	ctg	ccc	gac	ctg	atg	ggg	ctc	aaa	1776	
Ser	Arg	Asp	Val	Ile	Ile	Asp	Gln	Leu	Pro	Asp	Leu	Met	Gly	Leu	Lys		
			580					585					590				
gct	gtg	aat	gtg	gcc	aag	gtc	gtc	gga	acc	aac	ccg	tgt	gcg	gac	agg	1824	
Ala	Val	Asn	Val	Ala	Lys	Val	Val	Gly	Thr	Asn	Pro	Cys	Ala	Asp	Arg		
		595					600					605					
aac	ggg	ggg	tgc	agc	cac	ctg	tgc	ttc	ttc	aca	ccc	cac	gca	acc	cgg	1872	
Asn	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Leu	Cys	Phe	Phe	Thr	Pro	His	Ala	Thr	Arg		
	610					615					620						
tgt	ggc	tgc	ccc	atc	ggc	ctg	gag	ctg	ctg	agt	gac	atg	aag	acc	tgc	1920	
Cys	Gly	Cys	Pro	Ile	Gly	Leu	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Met	Lys	Thr	Cys		
	625				630					635					640		
atc	gtg	cct	gag	gcc	ttc	ttg	gtc	ttc	acc	agc	aga	gcc	gcc	atc	cac	1968	
Ile	Val	Pro	Glu	Ala	Phe	Leu	Val	Phe	Thr	Ser	Arg	Ala	Ala	Ile	His		
				645					650					655			
agg	atc	tcc	ctc	gag	acc	aat	aac	aac	gac	gtg	gcc	atc	ccg	ctc	acg	2016	
Arg	Ile	Ser	Leu	Glu	Thr	Asn	Asn	Asn	Asp	Val	Ala	Ile	Pro	Leu	Thr		
			660					665					670				
ggc	gtc	aag	gag	gcc	tca	gcc	ctg	gac	ttt	gat	gtg	tcc	aac	aac	cac	2064	
Gly	Val	Lys	Glu	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp	Phe	Asp	Val	Ser	Asn	Asn	His		
		675					680					685					
atc	tac	tgg	aca	gac	gtc	agc	ctg	aag	acc	atc	agc	cgc	gcc	ttc	atg	2112	
Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Phe	Met		
	690					695					700						
aac	ggg	agc	tgc	gtg	gag	cac	gtg	gtg	gag	ttt	ggc	ctt	gac	tac	ccc	2160	
Asn	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	His	Val	Val	Glu	Phe	Gly	Leu	Asp	Tyr	Pro		
	705				710				715						720		
gag	ggc	atg	gcc	gtt	gac	tgg	atg	ggc	aag	aac	ctc	tac	tgg	gcc	gac	2208	
Glu	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Trp	Met	Gly	Lys	Asn	Leu	Tyr	Trp	Ala	Asp		
				725					730					735			
act	ggg	acc	aac	aga	atc	gaa	gtg	gcg	cgg	ctg	gac	ggg	cag	ttc	cgg	2256	
Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Asp	Gly	Gln	Phe	Arg		
			740					745					750				
caa	gtc	ctc	gtg	tgg	agg	gac	ttg	gac	aac	ccg	agg	tgc	ctg	gcc	ctg	2304	
Gln	Val	Leu	Val	Trp	Arg	Asp	Leu	Asp	Asn	Pro	Arg	Ser	Leu	Ala	Leu		
			755				760					765					
gat	ccc	acc	aag	ggc	tac	atc	tac	tgg	acc	gag	tgg	ggc	ggc	aag	ccg	2352	
Asp	Pro	Thr	Lys	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Thr	Glu	Trp	Gly	Gly	Lys	Pro		
	770					775					780						
agg	atc	gtg	cgg	gcc	ttc	atg	gac	ggg	acc	aac	tgc	atg	acg	ctg	gtg	2400	
Arg	Ile	Val	Arg	Ala	Phe	Met	Asp	Gly	Thr	Asn	Cys	Met	Thr	Leu	Val		
	785				790					795					800		
gac	aag	gtg	ggc	cgg	gcc	aac	gac	ctc	acc	att	gac	tac	gct	gac	cag	2448	

ES 2 414 460 T3

Asp	Lys	Val	Gly	Arg	Ala	Asn	Asp	Leu	Thr	Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gln	
				805					810					815		
cgc	ctc	tac	tgg	acc	gac	ctg	gac	acc	aac	atg	atc	gag	tcg	tcc	aac	2496
Arg	Leu	Tyr	Trp	Thr	Asp	Leu	Asp	Thr	Asn	Met	Ile	Glu	Ser	Ser	Asn	
			820					825					830			
atg	ctg	ggg	cag	gag	cgg	gtc	gtg	att	gcc	gac	gat	ctc	ccg	cac	ccg	2544
Met	Leu	Gly	Gln	Glu	Arg	Val	Val	Ile	Ala	Asp	Asp	Leu	Pro	His	Pro	
			835				840						845			
ttc	ggg	ctg	acg	cag	tac	agc	gat	tat	atc	tac	tgg	aca	gac	tgg	aat	2592
Phe	Gly	Leu	Thr	Gln	Tyr	Ser	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Trp	Asn	
			850				855					860				
ctg	cac	agc	att	gag	cgg	gcc	gac	aag	act	agc	ggc	cgg	aac	cgc	acc	2640
Leu	His	Ser	Ile	Glu	Arg	Ala	Asp	Lys	Thr	Ser	Gly	Arg	Asn	Arg	Thr	
						870					875				880	
ctc	atc	cag	ggc	cac	ctg	gac	ttc	gtg	atg	gac	atc	ctg	gtg	ttc	cac	2688
Leu	Ile	Gln	Gly	His	Leu	Asp	Phe	Val	Met	Asp	Ile	Leu	Val	Phe	His	
						885									895	
tcc	tcc	cgc	cag	gat	ggc	ctc	aat	gac	tgt	atg	cac	aac	aac	ggg	cag	2736
Ser	Ser	Arg	Gln	Asp	Gly	Leu	Asn	Asp	Cys	Met	His	Asn	Asn	Gly	Gln	
						900									910	
tgt	ggg	cag	ctg	tgc	ctt	gcc	atc	ccc	ggc	ggc	cac	cgc	tgc	ggc	tgc	2784
Cys	Gly	Gln	Leu	Cys	Leu	Ala	Ile	Pro	Gly	Gly	His	Arg	Cys	Gly	Cys	
						915									925	
gcc	tca	cac	tac	acc	ctg	gac	ccc	agc	agc	cgc	aac	tgc	agc	ccg	ccc	2832
Ala	Ser	His	Tyr	Thr	Leu	Asp	Pro	Ser	Ser	Arg	Asn	Cys	Ser	Pro	Pro	
						930									940	
acc	acc	ttc	ttg	ctg	ttc	agc	cag	aaa	tct	gcc	atc	agt	cgg	atg	atc	2880
Thr	Thr	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Gln	Lys	Ser	Ala	Ile	Ser	Arg	Met	Ile	
						945									960	
ccg	gac	gac	cag	cac	agc	ccg	gat	ctc	atc	ctg	ccc	ctg	cat	gga	ctg	2928
Pro	Asp	Asp	Gln	His	Ser	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu	Pro	Leu	His	Gly	Leu	
						965									975	
agg	aac	gtc	aaa	gcc	atc	gac	tat	gac	cca	ctg	gac	aag	ttc	atc	tac	2976
Arg	Asn	Val	Lys	Ala	Ile	Asp	Tyr	Asp	Pro	Leu	Asp	Lys	Phe	Ile	Tyr	
						980									990	
tgg	gtg	gat	ggg	cgc	cag	aac	atc	aag	cga	gcc	aag	gac	gac	ggg	acc	3024
Trp	Val	Asp	Gly	Arg	Gln	Asn	Ile	Lys	Arg	Ala	Lys	Asp	Asp	Gly	Thr	
						995									1005	
cag	ccc	ttt	gtt	ttg	acc	tct	ctg	agc	caa	ggc	caa	aac	cca	gac		3069
Gln	Pro	Phe	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Ser	Gln	Gly	Gln	Asn	Pro	Asp		
						1010									1020	
agg	cag	ccc	cac	gac	ctc	agc	atc	gac	atc	tac	agc	cgg	aca	ctg		3114
Arg	Gln	Pro	His	Asp	Leu	Ser	Ile	Asp	Ile	Tyr	Ser	Arg	Thr	Leu		
						1025									1035	
ttc	tgg	acg	tgc	gag	gcc	acc	aat	acc	atc	aac	gtc	cac	agg	ctg		3159

ES 2 414 460 T3

Phe	Trp	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Asn	Thr	Ile	Asn	Val	His	Arg	Leu	
1040						1045					1050				
agc	ggg	gaa	gcc	atg	ggg	gtg	gtg	ctg	cgt	ggg	gac	cgc	gac	aag	3204
Ser	Gly	Glu	Ala	Met	Gly	Val	Val	Leu	Arg	Gly	Asp	Arg	Asp	Lys	
1055						1060					1065				
ccc	agg	gcc	atc	gtc	gtc	aac	gcg	gag	cga	ggg	tac	ctg	tac	ttc	3249
Pro	Arg	Ala	Ile	Val	Val	Asn	Ala	Glu	Arg	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Phe	
1070						1075					1080				
acc	aac	atg	cag	gac	cgg	gca	gcc	aag	atc	gaa	cgc	gca	gcc	ctg	3294
Thr	Asn	Met	Gln	Asp	Arg	Ala	Ala	Lys	Ile	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	
1085						1090					1095				
gac	ggc	acc	gag	cgc	gag	gtc	ctc	ttc	acc	acc	ggc	ctc	atc	cgc	3339
Asp	Gly	Thr	Glu	Arg	Glu	Val	Leu	Phe	Thr	Thr	Gly	Leu	Ile	Arg	
1100						1105					1110				
cct	gtg	gcc	ctg	gtg	gta	gac	aac	aca	ctg	ggc	aag	ctg	ttc	tgg	3384
Pro	Val	Ala	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Gly	Lys	Leu	Phe	Trp	
1115						1120					1125				
gtg	gac	gcg	gac	ctg	aag	cgc	att	gag	agc	tgt	gac	ctg	tca	ggg	3429
Val	Asp	Ala	Asp	Leu	Lys	Arg	Ile	Glu	Ser	Cys	Asp	Leu	Ser	Gly	
1130						1135					1140				
gcc	aac	cgc	ctg	acc	ctg	gag	gac	gcc	aac	atc	gtg	cag	cct	ctg	3474
Ala	Asn	Arg	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Ala	Asn	Ile	Val	Gln	Pro	Leu	
1145						1150					1155				
ggc	ctg	acc	atc	ctt	ggc	aag	cat	ctc	tac	tgg	atc	gac	cgc	cag	3519
Gly	Leu	Thr	Ile	Leu	Gly	Lys	His	Leu	Tyr	Trp	Ile	Asp	Arg	Gln	
1160						1165					1170				
cag	cag	atg	atc	gag	cgt	gtg	gag	aag	acc	acc	ggg	gac	aag	cgg	3564
Gln	Gln	Met	Ile	Glu	Arg	Val	Glu	Lys	Thr	Thr	Gly	Asp	Lys	Arg	
1175						1180					1185				
act	cgc	atc	cag	ggc	cgt	gtc	gcc	cac	ctc	act	ggc	atc	cat	gca	3609
Thr	Arg	Ile	Gln	Gly	Arg	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Ile	His	Ala	
1190						1195					1200				
gtg	gag	gaa	gtc	agc	ctg	gag	gag	ttc	tca	gcc	cac	cca	tgt	gcc	3654
Val	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Glu	Glu	Phe	Ser	Ala	His	Pro	Cys	Ala	
1205						1210					1215				
cgt	gac	aat	ggt	ggc	tgc	tcc	cac	atc	tgt	att	gcc	aag	ggt	gat	3699
Arg	Asp	Asn	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Ile	Cys	Ile	Ala	Lys	Gly	Asp	
1220						1225					1230				
ggg	aca	cca	cgg	tgc	tca	tgc	cca	gtc	cac	ctc	gtg	ctc	ctg	cag	3744
Gly	Thr	Pro	Arg	Cys	Ser	Cys	Pro	Val	His	Leu	Val	Leu	Leu	Gln	
1235						1240					1245				
aac	ctg	ctg	acc	tgt	gga	gag	ccg	ccc	acc	tgc	tcc	ccg	gac	cag	3789
Asn	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Glu	Pro	Pro	Thr	Cys	Ser	Pro	Asp	Gln	
1250						1255					1260				
ttt	gca	tgt	gcc	aca	ggg	gag	atc	gac	tgt	atc	ccc	ggg	gcc	tgg	3834

ES 2 414 460 T3

Phe	Ala	Cys	Ala	Thr	Gly	Glu	Ile	Asp	Cys	Ile	Pro	Gly	Ala	Trp	
1265						1270					1275				
cgc	tgt	gac	ggc	ttt	ccc	gag	tgc	gat	gac	cag	agc	gac	gag	gag	3879
Arg	Cys	Asp	Gly	Phe	Pro	Glu	Cys	Asp	Asp	Gln	Ser	Asp	Glu	Glu	
1280						1285					1290				
ggc	tgc	ccc	gtg	tgc	tcc	gcc	gcc	cag	ttc	ccc	tgc	gcg	cgg	ggt	3924
Gly	Cys	Pro	Val	Cys	Ser	Ala	Ala	Gln	Phe	Pro	Cys	Ala	Arg	Gly	
1295						1300					1305				
cag	tgt	gtg	gac	ctg	cgc	ctg	cgc	tgc	gac	ggc	gag	gca	gac	tgt	3969
Gln	Cys	Val	Asp	Leu	Arg	Leu	Arg	Cys	Asp	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	
1310						1315					1320				
cag	gac	cgc	tca	gac	gag	gcg	gac	tgt	gac	gcc	atc	tgc	ctg	ccc	4014
Gln	Asp	Arg	Ser	Asp	Glu	Ala	Asp	Cys	Asp	Ala	Ile	Cys	Leu	Pro	
1325						1330					1335				
aac	cag	ttc	cgg	tgt	gcg	agc	ggc	cag	tgt	gtc	ctc	atc	aaa	cag	4059
Asn	Gln	Phe	Arg	Cys	Ala	Ser	Gly	Gln	Cys	Val	Leu	Ile	Lys	Gln	
1340						1345					1350				
cag	tgc	gac	tcc	ttc	ccc	gac	tgt	atc	gac	ggc	tcc	gac	gag	ctc	4104
Gln	Cys	Asp	Ser	Phe	Pro	Asp	Cys	Ile	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Leu	
1355						1360					1365				
atg	tgt	gaa	atc	acc	aag	ccg	ccc	tca	gac	gac	agc	ccg	gcc	cac	4149
Met	Cys	Glu	Ile	Thr	Lys	Pro	Pro	Ser	Asp	Asp	Ser	Pro	Ala	His	
1370						1375					1380				
agc	agt	gcc	atc	ggg	ccc	gtc	att	ggc	atc	atc	ctc	tct	ctc	ttc	4194
Ser	Ser	Ala	Ile	Gly	Pro	Val	Ile	Gly	Ile	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	
1385						1390					1395				
gtc	atg	ggg	ggg	gtc	tat	ttt	gtg	tgc	cag	cgc	gtg	gtg	tgc	cag	4239
Val	Met	Gly	Gly	Val	Tyr	Phe	Val	Cys	Gln	Arg	Val	Val	Cys	Gln	
1400						1405					1410				
cgc	tat	gcg	ggg	gcc	aac	ggg	ccc	ttc	ccg	cac	gag	tat	gtc	agc	4284
Arg	Tyr	Ala	Gly	Ala	Asn	Gly	Pro	Phe	Pro	His	Glu	Tyr	Val	Ser	
1415						1420					1425				
ggg	acc	ccg	cac	gtg	ccc	ctc	aat	ttc	ata	gcc	ccg	ggc	ggg	tcc	4329
Gly	Thr	Pro	His	Val	Pro	Leu	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Gly	Gly	Ser	
1430						1435					1440				
cag	cat	ggc	ccc	ttc	aca	ggc	atc	gca	tgc	gga	aag	tcc	atg	atg	4374
Gln	His	Gly	Pro	Phe	Thr	Gly	Ile	Ala	Cys	Gly	Lys	Ser	Met	Met	
1445						1450					1455				
agc	tcc	gtg	agc	ctg	atg	ggg	ggc	cgg	ggc	ggg	gtg	ccc	ctc	tac	4419
Ser	Ser	Val	Ser	Leu	Met	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Val	Pro	Leu	Tyr	
1460						1465					1470				
gac	cgg	aac	cac	gtc	aca	ggg	gcc	tcg	tcc	agc	agc	tcg	tcc	agc	4464
Asp	Arg	Asn	His	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	
1475						1480					1485				
acg	aag	gcc	acg	ctg	tac	ccg	ccg	atc	ctg	aac	ccg	ccg	ccc	tcc	4509

ES 2 414 460 T3

Thr	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ile	Leu	Asn	Pro	Pro	Pro	Ser	
1490						1495						1500			
ccg	gcc	acg	gac	ccc	tcc	ctg	tac	aac	atg	gac	atg	ttc	tac	tct	4554
Pro	Ala	Thr	Asp	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn	Met	Asp	Met	Phe	Tyr	Ser	
1505						1510						1515			
tca	aac	att	ccg	gcc	act	gtg	aga	ccg	tac	agg	ccc	tac	atc	att	4599
Ser	Asn	Ile	Pro	Ala	Thr	Val	Arg	Pro	Tyr	Arg	Pro	Tyr	Ile	Ile	
1520						1525						1530			
cga	gga	atg	gcg	ccc	ccg	acg	acg	ccc	tgc	agc	acc	gac	gtg	tgt	4644
Arg	Gly	Met	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Pro	Cys	Ser	Thr	Asp	Val	Cys	
1535						1540						1545			
gac	agc	gac	tac	agc	gcc	agc	cgc	tgg	aag	gcc	agc	aag	tac	tac	4689
Asp	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ala	Ser	Arg	Trp	Lys	Ala	Ser	Lys	Tyr	Tyr	
1550						1555						1560			
ctg	gat	ttg	aac	tcg	gac	tca	gac	ccc	tat	cca	ccc	cca	ccc	acg	4734
Leu	Asp	Leu	Asn	Ser	Asp	Ser	Asp	Pro	Tyr	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr	
1565						1570						1575			
ccc	cac	agc	cag	tac	ctg	tcg	gcg	gag	gac	agc	tgc	ccg	ccc	tcg	4779
Pro	His	Ser	Gln	Tyr	Leu	Ser	Ala	Glu	Asp	Ser	Cys	Pro	Pro	Ser	
1580						1585						1590			
ccc	gcc	acc	gag	agg	agc	tac	ttc	cat	ctc	ttc	ccg	ccc	cct	ccg	4824
Pro	Ala	Thr	Glu	Arg	Ser	Tyr	Phe	His	Leu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	
1595						1600						1605			
tcc	ccc	tgc	acg	gac	tca	tcc	tga								4848
Ser	Pro	Cys	Thr	Asp	Ser	Ser									
1610						1615									

<210>	6
<211>	1615
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

```

<400> 6
Met Glu Ala Ala Pro Pro Gly Pro Pro Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu
1          5          10          15
Leu Leu Leu Leu Ala Leu Cys Gly Cys Pro Ala Pro Ala Ala Ala Ser
20          25          30
Pro Leu Leu Leu Phe Ala Asn Arg Arg Asp Val Arg Leu Val Asp Ala
35          40          45
Gly Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Ile Val Val Ser Gly Leu Glu Asp
50          55          60
Ala Ala Ala Val Asp Phe Gln Phe Ser Lys Gly Ala Val Tyr Trp Thr
65          70          75          80

```

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Cys Ala Cys Pro Thr Gly Val Gln Leu Gln Asp Asn Gly Arg Thr Cys
 325 330 335
 Lys Ala Gly Ala Glu Glu Val Leu Leu Leu Ala Arg Arg Thr Asp Leu
 340 345 350
 Arg Arg Ile Ser Leu Asp Thr Pro Asp Phe Thr Asp Ile Val Leu Gln
 355 360 365
 Val Asp Asp Ile Arg His Ala Ile Ala Ile Asp Tyr Asp Pro Leu Glu
 370 375 380
 Gly Tyr Val Tyr Trp Thr Asp Asp Glu Val Arg Ala Ile Arg Arg Ala
 385 390 395 400
 Tyr Leu Asp Gly Ser Gly Ala Gln Thr Leu Val Asn Thr Glu Ile Asn
 405 410 415
 Asp Pro Asp Gly Ile Ala Val Asp Trp Val Ala Arg Asn Leu Tyr Trp
 420 425 430
 Thr Asp Thr Gly Thr Asp Arg Ile Glu Val Thr Arg Leu Asn Gly Thr
 435 440 445
 Ser Arg Lys Ile Leu Val Ser Glu Asp Leu Asp Glu Pro Arg Ala Ile
 450 455 460
 Ala Leu His Pro Val Met Gly Leu Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Glu
 465 470 475 480
 Asn Pro Lys Ile Glu Cys Ala Asn Leu Asp Gly Gln Glu Arg Arg Val
 485 490 495
 Leu Val Asn Ala Ser Leu Gly Trp Pro Asn Gly Leu Ala Leu Asp Leu
 500 505 510
 Gln Glu Gly Lys Leu Tyr Trp Gly Asp Ala Lys Thr Asp Lys Ile Glu
 515 520 525
 Val Ile Asn Val Asp Gly Thr Lys Arg Arg Thr Leu Leu Glu Asp Lys
 530 535 540
 Leu Pro His Ile Phe Gly Phe Thr Leu Leu Gly Asp Phe Ile Tyr Trp
 545 550 555 560

ES 2 414 460 T3

Thr Asp Trp Gln Arg Arg Ser Ile Glu Arg Val His Lys Val Lys Ala
 565 570 575
 Ser Arg Asp Val Ile Ile Asp Gln Leu Pro Asp Leu Met Gly Leu Lys
 580 585 590
 Ala Val Asn Val Ala Lys Val Val Gly Thr Asn Pro Cys Ala Asp Arg
 595 600 605
 Asn Gly Gly Cys Ser His Leu Cys Phe Phe Thr Pro His Ala Thr Arg
 610 615 620
 Cys Gly Cys Pro Ile Gly Leu Glu Leu Leu Ser Asp Met Lys Thr Cys
 625 630 635 640
 Ile Val Pro Glu Ala Phe Leu Val Phe Thr Ser Arg Ala Ala Ile His
 645 650 655
 Arg Ile Ser Leu Glu Thr Asn Asn Asn Asp Val Ala Ile Pro Leu Thr
 660 665 670
 Gly Val Lys Glu Ala Ser Ala Leu Asp Phe Asp Val Ser Asn Asn His
 675 680 685
 Ile Tyr Trp Thr Asp Val Ser Leu Lys Thr Ile Ser Arg Ala Phe Met
 690 695 700
 Asn Gly Ser Ser Val Glu His Val Val Glu Phe Gly Leu Asp Tyr Pro
 705 710 715 720
 Glu Gly Met Ala Val Asp Trp Met Gly Lys Asn Leu Tyr Trp Ala Asp
 725 730 735
 Thr Gly Thr Asn Arg Ile Glu Val Ala Arg Leu Asp Gly Gln Phe Arg
 740 745 750
 Gln Val Leu Val Trp Arg Asp Leu Asp Asn Pro Arg Ser Leu Ala Leu
 755 760 765
 Asp Pro Thr Lys Gly Tyr Ile Tyr Trp Thr Glu Trp Gly Gly Lys Pro
 770 775 780
 Arg Ile Val Arg Ala Phe Met Asp Gly Thr Asn Cys Met Thr Leu Val
 785 790 795 800

ES 2 414 460 T3

Asp Lys Val Gly Arg Ala Asn Asp Leu Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Gln
 805 810 815

Arg Leu Tyr Trp Thr Asp Leu Asp Thr Asn Met Ile Glu Ser Ser Asn
 820 825 830

Met Leu Gly Gln Glu Arg Val Val Ile Ala Asp Asp Leu Pro His Pro
 835 840 845

Phe Gly Leu Thr Gln Tyr Ser Asp Tyr Ile Tyr Trp Thr Asp Trp Asn
 850 855 860

Leu His Ser Ile Glu Arg Ala Asp Lys Thr Ser Gly Arg Asn Arg Thr
 865 870 875 880

Leu Ile Gln Gly His Leu Asp Phe Val Met Asp Ile Leu Val Phe His
 885 890 895

Ser Ser Arg Gln Asp Gly Leu Asn Asp Cys Met His Asn Asn Gly Gln
 900 905 910

Cys Gly Gln Leu Cys Leu Ala Ile Pro Gly Gly His Arg Cys Gly Cys
 915 920 925

Ala Ser His Tyr Thr Leu Asp Pro Ser Ser Arg Asn Cys Ser Pro Pro
 930 935 940

Thr Thr Phe Leu Leu Phe Ser Gln Lys Ser Ala Ile Ser Arg Met Ile
 945 950 955 960

Pro Asp Asp Gln His Ser Pro Asp Leu Ile Leu Pro Leu His Gly Leu
 965 970 975

Arg Asn Val Lys Ala Ile Asp Tyr Asp Pro Leu Asp Lys Phe Ile Tyr
 980 985 990

Trp Val Asp Gly Arg Gln Asn Ile Lys Arg Ala Lys Asp Asp Gly Thr
 995 1000 1005

Gln Pro Phe Val Leu Thr Ser Leu Ser Gln Gly Gln Asn Pro Asp
 1010 1015 1020

Arg Gln Pro His Asp Leu Ser Ile Asp Ile Tyr Ser Arg Thr Leu
 1025 1030 1035

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Thr Lys Ala Thr Leu Tyr Pro Pro Ile Leu Asn Pro Pro Pro Ser
1490 1495 1500

Pro Ala Thr Asp Pro Ser Leu Tyr Asn Met Asp Met Phe Tyr Ser
1505 1510 1515

Ser Asn Ile Pro Ala Thr Val Arg Pro Tyr Arg Pro Tyr Ile Ile
1520 1525 1530

Arg Gly Met Ala Pro Pro Thr Thr Pro Cys Ser Thr Asp Val Cys
1535 1540 1545

Asp Ser Asp Tyr Ser Ala Ser Arg Trp Lys Ala Ser Lys Tyr Tyr
1550 1555 1560

Leu Asp Leu Asn Ser Asp Ser Asp Pro Tyr Pro Pro Pro Pro Thr
1565 1570 1575

Pro His Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Glu Asp Ser Cys Pro Pro Ser
1580 1585 1590

Pro Ala Thr Glu Arg Ser Tyr Phe His Leu Phe Pro Pro Pro Pro
1595 1600 1605

Ser Pro Cys Thr Asp Ser Ser
1610 1615

<210> 7
<211> 4842
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(4842)

<400> 7

atg ggg gcc gtc ctg agg agc ctc ctg gcc tgc agc ttc tgt gtg ctc 48
Met Gly Ala Val Leu Arg Ser Leu Leu Ala Cys Ser Phe Cys Val Leu
1 5 10 15

ctg aga gcg gcc cct ttg ttg ctt tat gca aac aga cgg gac ttg cga 96
Leu Arg Ala Ala Pro Leu Leu Leu Tyr Ala Asn Arg Arg Asp Leu Arg
20 25 30

ttg gtt gat gct aca aat ggc aaa gag aat gct acg att gta gtt gga 144
Leu Val Asp Ala Thr Asn Gly Lys Glu Asn Ala Thr Ile Val Val Gly
35 40 45

10 ggc ttg gag gat gca gct gcg gtg gac ttt gtg ttt agt cat ggc ttg 192

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Asp	Asn	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Leu	Cys	Leu	Met	Ser	Pro	Val	Lys	Pro	
290						295					300					
ttt	tat	cag	tgt	gct	tgc	ccc	act	ggg	gtc	aaa	ctc	ctg	gag	aat	gga	960
Phe	Tyr	Gln	Cys	Ala	Cys	Pro	Thr	Gly	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Asn	Gly	
305					310					315					320	
aaa	acc	tgc	aaa	gat	ggg	gcc	aca	gaa	tta	ttg	ctt	tta	gct	cga	agg	1008
Lys	Thr	Cys	Lys	Asp	Gly	Ala	Thr	Glu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Arg	
				325					330					335		
aca	gac	ttg	aga	cgc	att	tct	ttg	gat	aca	cca	gat	ttt	aca	gac	att	1056
Thr	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Asp	Thr	Pro	Asp	Phe	Thr	Asp	Ile	
			340					345					350			
gtt	ctg	cag	tta	gaa	gac	atc	cgt	cat	gcc	att	gcc	ata	gat	tac	gat	1104
Val	Leu	Gln	Leu	Glu	Asp	Ile	Arg	His	Ala	Ile	Ala	Ile	Asp	Tyr	Asp	
		355					360					365				
cct	gtg	gaa	ggc	tac	atc	tac	tgg	act	gat	gat	gaa	gtg	agg	gcc	ata	1152
Pro	Val	Glu	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Asp	Glu	Val	Arg	Ala	Ile	
		370				375					380					
cgc	cgt	tca	ttt	ata	gat	gga	tct	ggc	agt	cag	ttt	gtg	gtc	act	gct	1200
Arg	Arg	Ser	Phe	Ile	Asp	Gly	Ser	Gly	Ser	Gln	Phe	Val	Val	Thr	Ala	
385					390					395					400	
caa	att	gcc	cat	cct	gat	ggg	att	gct	gtg	gac	tgg	gtt	gca	cga	aat	1248
Gln	Ile	Ala	His	Pro	Asp	Gly	Ile	Ala	Val	Asp	Trp	Val	Ala	Arg	Asn	
				405				410						415		
ctt	tat	tgg	aca	gac	act	ggc	act	gat	cga	ata	gaa	gtg	aca	agg	ctc	1296
Leu	Tyr	Trp	Thr	Asp	Thr	Gly	Thr	Asp	Arg	Ile	Glu	Val	Thr	Arg	Leu	
			420					425					430			
aat	ggg	acc	atg	agg	aag	atc	ttg	att	tca	gag	gac	tta	gag	gaa	ccc	1344
Asn	Gly	Thr	Met	Arg	Lys	Ile	Leu	Ile	Ser	Glu	Asp	Leu	Glu	Glu	Pro	
		435					440					445				
cgg	gct	att	gtg	tta	gat	ccc	atg	gtt	ggg	tac	atg	tat	tgg	act	gac	1392
Arg	Ala	Ile	Val	Leu	Asp	Pro	Met	Val	Gly	Tyr	Met	Tyr	Trp	Thr	Asp	
		450				455					460					
tgg	gga	gaa	att	cgc	aaa	att	gag	cga	gca	gct	ctg	gat	ggg	tct	gac	1440
Trp	Gly	Glu	Ile	Pro	Lys	Ile	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Asp	Gly	Ser	Asp	
465					470				475						480	
cgt	gta	gta	ttg	gtt	aac	act	tct	ctt	ggg	tgg	cca	aat	ggg	tta	gcc	1488
Arg	Val	Val	Leu	Val	Asn	Thr	Ser	Leu	Gly	Trp	Pro	Asn	Gly	Leu	Ala	
				485					490					495		
ttg	gat	tat	gat	gaa	ggc	aaa	ata	tac	tgg	gga	gat	gcc	aaa	aca	gac	1536
Leu	Asp	Tyr	Asp	Glu	Gly	Lys	Ile	Tyr	Trp	Gly	Asp	Ala	Lys	Thr	Asp	
			500					505					510			
aag	att	gag	gtt	atg	aat	act	gat	ggc	act	ggg	aga	cga	gta	cta	gtg	1584
Lys	Ile	Glu	Val	Met	Asn	Thr	Asp	Gly	Thr	Gly	Arg	Arg	Val	Leu	Val	
		515					520					525				
gaa	gac	aaa	att	cct	cac	ata	ttt	gga	ttt	act	ttg	ttg	ggg	gac	tat	1632

ES 2 414 460 T3

Glu 530	Asp	Lys	Ile	Pro	His	Ile 535	Phe	Gly	Phe	Thr	Leu 540	Leu	Gly	Asp	Tyr	
gtt	tac	tgg	act	gac	tgg	cag	agg	cgt	agc	att	gaa	aga	gtt	cat	aaa	1680
Val	Tyr	Trp	Thr	Asp	Trp	Gln	Arg	Arg	Ser	Ile	Glu	Arg	Val	His	Lys	
545					550				555						560	
cga	agt	gca	gag	agg	gaa	gtg	atc	ata	gat	cag	ctg	cct	gac	ctc	atg	1728
Arg	Ser	Ala	Glu	Arg	Glu	Val	Ile	Ile	Asp	Gln	Leu	Pro	Asp	Leu	Met	
				565					570					575		
ggc	cta	aag	gct	aca	aat	gtt	cat	cga	gtg	att	ggc	tcc	aac	ccc	tgt	1776
Gly	Leu	Lys	Ala	Thr	Asn	Val	His	Arg	Val	Ile	Gly	Ser	Asn	Pro	Cys	
			580					585					590			
gct	gag	gaa	aac	ggg	gga	tgt	agc	cat	ctc	tgc	ctc	tat	aga	cct	cag	1824
Ala	Glu	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Leu	Cys	Leu	Tyr	Arg	Pro	Gln	
		595					600					605				
ggc	ctt	cgc	tgt	gct	tgc	cct	att	ggc	ttt	gaa	ctc	atc	agt	gac	atg	1872
Gly	Leu	Arg	Cys	Ala	Cys	Pro	Ile	Gly	Phe	Glu	Leu	Ile	Ser	Asp	Met	
	610					615					620					
aag	acc	tgc	att	gtc	cca	gag	gct	ttc	ctt	ttg	ttt	tca	cgg	aga	gca	1920
Lys	Thr	Cys	Ile	Val	Pro	Glu	Ala	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Arg	Arg	Ala	
625					630				635						640	
gat	atc	aga	cga	att	tct	ctg	gaa	aca	aac	aat	aat	aat	gtg	gct	att	1968
Asp	Ile	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Glu	Thr	Asn	Asn	Asn	Asn	Val	Ala	Ile	
				645					650					655		
cca	ctc	act	ggc	gtc	aaa	gaa	gct	tct	gct	ttg	gat	ttt	gat	gtg	aca	2016
Pro	Leu	Thr	Gly	Val	Lys	Glu	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp	Phe	Asp	Val	Thr	
			660					665					670			
gac	aac	cga	att	tat	tgg	act	gat	ata	tca	ctc	aag	acc	atc	agc	aga	2064
Asp	Asn	Arg	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Ile	Ser	Leu	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	
		675					680					685				
gcc	ttt	atg	aat	ggc	agt	gca	ctg	gaa	cat	gtg	gta	gaa	ttc	ggc	tta	2112
Ala	Phe	Met	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu	Glu	His	Val	Val	Glu	Phe	Gly	Leu	
	690					695					700					
gat	tat	cca	gaa	ggc	atg	gca	gta	gac	tgg	ctt	ggg	aag	aac	ttg	tac	2160
Asp	Tyr	Pro	Glu	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Trp	Leu	Gly	Lys	Asn	Leu	Tyr	
705					710				715						720	
tgg	gca	gac	aca	gga	acg	aat	cga	att	gag	gtg	tca	aag	ttg	gat	ggg	2208
Trp	Ala	Asp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Gly	
				725					730					735		
cag	cac	cga	caa	gtt	ttg	gtg	tgg	aaa	gac	cta	gat	agt	ccc	aga	gct	2256
Gln	His	Arg	Gln	Val	Leu	Val	Trp	Lys	Asp	Leu	Asp	Ser	Pro	Arg	Ala	
			740					745					750			
ctc	gcg	ttg	gac	cct	gcc	gaa	gga	ttt	atg	tat	tgg	act	gaa	tgg	ggc	2304
Leu	Ala	Leu	Asp	Pro	Ala	Glu	Gly	Phe	Met	Tyr	Trp	Thr	Glu	Trp	Gly	
		755					760					765				
gga	aaa	cct	aag	ata	gac	aga	gct	gca	atg	gat	gga	agt	gaa	cgt	act	2352

ES 2 414 460 T3

Gly	Lys	Pro	Lys	Ile	Asp	Arg	Ala	Ala	Met	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Thr	
770						775					780					
acc	tta	gtt	cca	aat	gtg	ggg	cgg	gca	aac	ggc	cta	act	att	gat	tat	2400
Thr	Leu	Val	Pro	Asn	Val	Gly	Arg	Ala	Asn	Gly	Leu	Thr	Ile	Asp	Tyr	
785					790					795					800	
gct	aaa	agg	agg	ctt	tat	tgg	aca	gac	ctg	gac	acc	aac	tta	ata	gaa	2448
Ala	Lys	Arg	Arg	Leu	Tyr	Trp	Thr	Asp	Leu	Asp	Thr	Asn	Leu	Ile	Glu	
				805					810					815		
tct	tca	aat	atg	ctt	ggg	ctc	aac	cgt	gaa	gtt	ata	gca	gat	gac	ttg	2496
Ser	Ser	Asn	Met	Leu	Gly	Leu	Asn	Arg	Glu	Val	Ile	Ala	Asp	Asp	Leu	
			820					825					830			
cct	cat	cct	ttt	ggc	tta	act	cag	tac	caa	gat	tat	atc	tac	tgg	acg	2544
Pro	His	Pro	Phe	Gly	Leu	Thr	Gln	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Thr	
		835					840					845				
gac	tgg	agc	cga	cgc	agc	att	gag	cgt	gcc	aac	aaa	acc	agt	ggc	caa	2592
Asp	Trp	Ser	Arg	Arg	Ser	Ile	Glu	Arg	Ala	Asn	Lys	Thr	Ser	Gly	Gln	
	850					855					860					
aac	cgc	acc	atc	att	cag	ggc	cat	ttg	gat	tat	gtg	atg	gac	atc	ctc	2640
Asn	Arg	Thr	Ile	Ile	Gln	Gly	His	Leu	Asp	Tyr	Val	Met	Asp	Ile	Leu	
865					870					875					880	
gtc	ttt	cac	tca	tct	cga	cag	tca	ggg	tgg	aat	gaa	tgt	gct	tcc	agc	2688
Val	Phe	His	Ser	Ser	Arg	Gln	Ser	Gly	Trp	Asn	Glu	Cys	Ala	Ser	Ser	
				885					890					895		
aat	ggg	cac	tgc	tcc	cac	ctc	tgc	ttg	gct	gtg	cca	gtt	ggg	ggt	ttt	2736
Asn	Gly	His	Cys	Ser	His	Leu	Cys	Leu	Ala	Val	Pro	Val	Gly	Gly	Phe	
			900					905					910			
gtt	tgt	gga	tgc	cct	gcc	cac	tac	tct	ctt	aat	gct	gac	aac	agg	act	2784
Val	Cys	Gly	Cys	Pro	Ala	His	Tyr	Ser	Leu	Asn	Ala	Asp	Asn	Arg	Thr	
		915					920					925				
tgt	agt	gct	cct	acg	act	ttc	ctg	ctc	ttc	agt	caa	aag	agt	gcc	atc	2832
Cys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Gln	Lys	Ser	Ala	Ile	
	930					935					940					
aac	cgc	atg	gtg	att	gat	gaa	caa	cag	agc	ccc	gac	atc	atc	ctt	ccc	2880
Asn	Arg	Met	Val	Ile	Asp	Glu	Gln	Gln	Ser	Pro	Asp	Ile	Ile	Leu	Pro	
945					950					955					960	
atc	cac	agc	ctt	cgg	aat	gtc	cgg	gcc	att	gac	tat	gac	cca	ctg	gac	2928
Ile	His	Ser	Leu	Arg	Asn	Val	Arg	Ala	Ile	Asp	Tyr	Asp	Pro	Leu	Asp	
				965					970					975		
aag	caa	ctc	tat	tgg	att	gac	tca	cga	caa	aac	atg	atc	cga	aag	gca	2976
Lys	Gln	Leu	Tyr	Trp	Ile	Asp	Ser	Arg	Gln	Asn	Met	Ile	Arg	Lys	Ala	
			980					985					990			
caa	gaa	gat	ggc	agc	cag	ggc	ttt	act	gtg	gtt	gtg	agc	tca	gtt	ccg	3024
Gln	Glu	Asp	Gly	Ser	Gln	Gly	Phe	Thr	Val	Val	Val	Ser	Ser	Val	Pro	
		995					1000					1005				
agt	cag	aac	ctg	gaa	ata	caa	ccc	tat	gac	ctc	agc	att	gat	att		3069

ES 2 414 460 T3

Ser Gln	Asn Leu Glu Ile	Gln Pro Tyr Asp Leu	Ser Ile Asp Ile	
1010		1015	1020	
tac agc	cgc tac atc tac	tgg act tgt gag gct	acc aat gtc att	3114
Tyr Ser	Arg Tyr Ile Tyr	Trp Thr Cys Glu Ala	Thr Asn Val Ile	
1025		1030	1035	
aat gtg	aca aga tta gat	ggg aga tca gtt gga	gtg gtg ctg aaa	3159
Asn Val	Thr Arg Leu Asp	Gly Arg Ser Val Gly	Val Val Leu Lys	
1040		1045	1050	
ggc gag	cag gac aga cct	cga gcc att gtg gta	aac cca gag aaa	3204
Gly Glu	Gln Asp Arg Pro	Arg Ala Ile Val Val	Asn Pro Glu Lys	
1055		1060	1065	
ggg tat	atg tat ttt acc	aat ctt cag gaa agg	tct cct aaa att	3249
Gly Tyr	Met Tyr Phe Thr	Asn Leu Gln Glu Arg	Ser Pro Lys Ile	
1070		1075	1080	
gaa cgg	gct gct ttg gat	ggg aca gaa cgg gag	gtc ctc ttt ttc	3294
Glu Arg	Ala Ala Leu Asp	Gly Thr Glu Arg Glu	Val Leu Phe Phe	
1085		1090	1095	
agt ggc	tta agt aaa cca	att gct tta gcc ctt	gat agc agg ctg	3339
Ser Gly	Leu Ser Lys Pro	Ile Ala Leu Ala Leu	Asp Ser Arg Leu	
1100		1105	1110	
ggc aag	ctc ttt tgg gct	gat tca gat ctc cgg	cga att gaa agc	3384
Gly Lys	Leu Phe Trp Ala	Asp Ser Asp Leu Arg	Arg Ile Glu Ser	
1115		1120	1125	
agt gat	ctc tca ggt gct	aac cgg ata gta tta	gaa gac tcc aat	3429
Ser Asp	Leu Ser Gly Ala	Asn Arg Ile Val Leu	Glu Asp Ser Asn	
1130		1135	1140	
atc ttg	cag cct gtg gga	ctt act gtg ttt gaa	aac tgg ctc tat	3474
Ile Leu	Gln Pro Val Gly	Leu Thr Val Phe Glu	Asn Trp Leu Tyr	
1145		1150	1155	
tgg att	gat aaa cag cag	caa atg att gaa aaa	att gac atg aca	3519
Trp Ile	Asp Lys Gln Gln	Gln Met Ile Glu Lys	Ile Asp Met Thr	
1160		1165	1170	
ggt cga	gag ggt aga acc	aaa gtc caa gct cga	att gcc cag ctt	3564
Gly Arg	Glu Gly Arg Thr	Lys Val Gln Ala Arg	Ile Ala Gln Leu	
1175		1180	1185	
agt gac	att cat gca gta	aag gag ctg aac ctt	caa gaa tac aga	3609
Ser Asp	Ile His Ala Val	Lys Glu Leu Asn Leu	Gln Glu Tyr Arg	
1190		1195	1200	
cag cac	cct tgt gct cag	gat aat ggt ggc tgt	tca cat att tgt	3654
Gln His	Pro Cys Ala Gln	Asp Asn Gly Gly Cys	Ser His Ile Cys	
1205		1210	1215	
ctt gta	aag ggg gat ggt	act aca agg tgt tct	tgc ccc atg cac	3699
Leu Val	Lys Gly Asp Gly	Thr Thr Arg Cys Ser	Cys Pro Met His	
1220		1225	1230	
ctg gtt	cta ctt caa gat	gag cta tca tgt gga	gaa cct cca aca	3744

ES 2 414 460 T3

Leu Val 1235	Leu Leu Gln Asp 1240	Glu 1245	Leu Ser Cys Gly 1245	Glu 1245	Pro Pro Thr	
tgt tct Cys Ser 1250	cct cag cag ttt Pro Gln Gln Phe 1255	act Thr 1255	tgt ttc acg ggg Cys Phe Thr Gly 1260	gaa Glu 1260	att gac tgt Ile Asp Cys	3789
atc cct Ile Pro 1265	gtg gct tgg cgg Val Ala Trp Arg 1270	tgc Cys 1270	gat ggg ttt act Asp Gly Phe Thr 1275	gaa Glu 1275	tgt gaa gac Cys Glu Asp	3834
cac agt His Ser 1280	gat gaa ctc aat Asp Glu Leu Asn 1285	tgt Cys 1285	cct gta tgc tca Pro Val Cys Ser 1290	gag Glu 1290	tcc cag ttc Ser Gln Phe	3879
cag tgt Gln Cys 1295	gcc agt ggg cag Ala Ser Gly Gln 1300	tgt Cys 1300	att gat ggt gcc Ile Asp Gly Ala 1305	ctc Leu 1305	cga tgc aat Arg Cys Asn	3924
gga gat Gly Asp 1310	gca aac tgc cag Ala Asn Cys Gln 1315	gac Asp 1315	aaa tca gat gag Lys Ser Asp Glu 1320	aag Lys 1320	aac tgt gaa Asn Cys Glu	3969
gtg ctt Val Leu 1325	tgt tta att gat Cys Leu Ile Asp 1330	cag Gln 1330	ttc cgc tgt gcc Phe Arg Cys Ala 1335	aat Asn 1335	ggg cag tgc Gly Gln Cys	4014
att gga Ile Gly 1340	aag cac aag aag Lys His Lys Lys 1345	tgt Cys 1345	gat cat aat gtg Asp His Asn Val 1350	gat Asp 1350	tgc agt gac Cys Ser Asp	4059
aag tca Lys Ser 1355	gat gaa ctg gat Asp Glu Leu Asp 1360	tgt Cys 1360	tat ccg act gaa Tyr Pro Thr Glu 1365	gaa Glu 1365	cca gca cca Pro Ala Pro	4104
cag gcc Gln Ala 1370	acc aat aca gtt Thr Asn Thr Val 1375	ggg Gly 1375	tct gtt att ggc Ser Val Ile Gly 1380	gta Val 1380	att gtc acc Ile Val Thr	4149
att ttt Ile Phe 1385	gtg tct gga act Val Ser Gly Thr 1390	gta Val 1390	tac ttt atc tgc Tyr Phe Ile Cys 1395	cag Gln 1395	agg atg ttg Arg Met Leu	4194
tgt cca Cys Pro 1400	cgt atg aag gga Arg Met Lys Gly 1405	gat Asp 1405	ggg gaa act atg Gly Glu Thr Met 1410	act Thr 1410	aat gac tat Asn Asp Tyr	4239
gta gtt Val Val 1415	cat gga cca gct His Gly Pro Ala 1420	tct Ser 1420	gtg cct ctt ggt Val Pro Leu Gly 1425	tat Tyr 1425	gtg cca cac Val Pro His	4284
cca agt Pro Ser 1430	tct ttg tca gga Ser Leu Ser Gly 1435	tct Ser 1435	ctt cca gga atg Leu Pro Gly Met 1440	tct Ser 1440	cga ggt aaa Arg Gly Lys	4329
tca atg Ser Met 1445	atc agc tcc ctc Ile Ser Ser Leu 1450	agt Ser 1450	atc atg ggg gga Ile Met Gly Gly 1455	agc Ser 1455	agt gga ccc Ser Gly Pro	4374
ccc tat	gac cga gcc cat	gtt	aca gga gca tca	tca	agt agt tct	4419

ES 2 414 460 T3

Pro Tyr Asp Arg Ala His Val Thr Gly Ala Ser Ser Ser Ser Ser	
1460 1465 1470	
tca agc acc aaa ggc act tac ttc cct gca att ttg aac cct cca	4464
Ser Ser Thr Lys Gly Thr Tyr Phe Pro Ala Ile Leu Asn Pro Pro	
1475 1480 1485	
cca tcc cca gcc aca gag cga tca cat tac act atg gaa ttt gga	4509
Pro Ser Pro Ala Thr Glu Arg Ser His Tyr Thr Met Glu Phe Gly	
1490 1495 1500	
tat tct tca aac agt cct tcc act cat agg tca tac agc tac agg	4554
Tyr Ser Ser Asn Ser Pro Ser Thr His Arg Ser Tyr Ser Tyr Arg	
1505 1510 1515	
cca tat agc tac cgg cac ttt gca ccc ccc acc aca ccc tgc agc	4599
Pro Tyr Ser Tyr Arg His Phe Ala Pro Pro Thr Thr Pro Cys Ser	
1520 1525 1530	
aca gat gtt tgt gac agt gac tat gct cct agt cgg aga atg acc	4644
Thr Asp Val Cys Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Ser Arg Arg Met Thr	
1535 1540 1545	
tca gtg gca aca gcc aag ggc tat acc agt gac ttg aac tat gat	4689
Ser Val Ala Thr Ala Lys Gly Tyr Thr Ser Asp Leu Asn Tyr Asp	
1550 1555 1560	
tca gaa cct gtg ccc cca cct ccc aca ccc cga agc caa tac ttg	4734
Ser Glu Pro Val Pro Pro Pro Pro Thr Pro Arg Ser Gln Tyr Leu	
1565 1570 1575	
tca gca gag gag aac tat gaa agc tgc cca cct tct cca tac aca	4779
Ser Ala Glu Glu Asn Tyr Glu Ser Cys Pro Pro Ser Pro Tyr Thr	
1580 1585 1590	
gag agg agc tat tct cat cac ctc tac cca ccg cca ccc tct ccc	4824
Glu Arg Ser Tyr Ser His His Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Ser Pro	
1595 1600 1605	
tgt aca gac tcc tcc tga	4842
Cys Thr Asp Ser Ser	
1610	

- <210> 8

<211> 1613

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

Leu Arg Ala Ala Pro Leu Leu Leu Tyr Ala Asn Arg Arg Asp Leu Arg
20 25 30

Leu Val Asp Ala Thr Asn Gly Lys Glu Asn Ala Thr Ile Val Val Gly
35 40 45

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Asp Asn Gly Gly Cys Ser His Leu Cys Leu Met Ser Pro Val Lys Pro
 290 295 300

Phe Tyr Gln Cys Ala Cys Pro Thr Gly Val Lys Leu Leu Glu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Thr Cys Lys Asp Gly Ala Thr Glu Leu Leu Leu Leu Ala Arg Arg
 325 330 335

Thr Asp Leu Arg Arg Ile Ser Leu Asp Thr Pro Asp Phe Thr Asp Ile
 340 345 350

Val Leu Gln Leu Glu Asp Ile Arg His Ala Ile Ala Ile Asp Tyr Asp
 355 360 365

Pro Val Glu Gly Tyr Ile Tyr Trp Thr Asp Asp Glu Val Arg Ala Ile
 370 375 380

Arg Arg Ser Phe Ile Asp Gly Ser Gly Ser Gln Phe Val Val Thr Ala
 385 390 395 400

Gln Ile Ala His Pro Asp Gly Ile Ala Val Asp Trp Val Ala Arg Asn
 405 410 415

Leu Tyr Trp Thr Asp Thr Gly Thr Asp Arg Ile Glu Val Thr Arg Leu
 420 425 430

Asn Gly Thr Met Arg Lys Ile Leu Ile Ser Glu Asp Leu Glu Glu Pro
 435 440 445

Arg Ala Ile Val Leu Asp Pro Met Val Gly Tyr Met Tyr Trp Thr Asp
 450 455 460

Trp Gly Glu Ile Pro Lys Ile Glu Arg Ala Ala Leu Asp Gly Ser Asp
 465 470 475 480

Arg Val Val Leu Val Asn Thr Ser Leu Gly Trp Pro Asn Gly Leu Ala
 485 490 495

Leu Asp Tyr Asp Glu Gly Lys Ile Tyr Trp Gly Asp Ala Lys Thr Asp
 500 505 510

Lys Ile Glu Val Met Asn Thr Asp Gly Thr Gly Arg Arg Val Leu Val
 515 520 525

ES 2 414 460 T3

Glu	Asp	Lys	Ile	Pro	His	Ile	Phe	Gly	Phe	Thr	Leu	Leu	Gly	Asp	Tyr
530						535					540				
Val	Tyr	Trp	Thr	Asp	Trp	Gln	Arg	Arg	Ser	Ile	Glu	Arg	Val	His	Lys
545					550					555					560
Arg	Ser	Ala	Glu	Arg	Glu	Val	Ile	Ile	Asp	Gln	Leu	Pro	Asp	Leu	Met
			565						570					575	
Gly	Leu	Lys	Ala	Thr	Asn	Val	His	Arg	Val	Ile	Gly	Ser	Asn	Pro	Cys
		580						585					590		
Ala	Glu	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Leu	Cys	Leu	Tyr	Arg	Pro	Gln
		595					600					605			
Gly	Leu	Arg	Cys	Ala	Cys	Pro	Ile	Gly	Phe	Glu	Leu	Ile	Ser	Asp	Met
610						615					620				
Lys	Thr	Cys	Ile	Val	Pro	Glu	Ala	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Arg	Arg	Ala
625					630					635					640
Asp	Ile	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Glu	Thr	Asn	Asn	Asn	Asn	Val	Ala	Ile
				645					650					655	
Pro	Leu	Thr	Gly	Val	Lys	Glu	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp	Phe	Asp	Val	Thr
			660					665					670		
Asp	Asn	Arg	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Ile	Ser	Leu	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg
		675					680					685			
Ala	Phe	Met	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu	Glu	His	Val	Val	Glu	Phe	Gly	Leu
		690				695					700				
Asp	Tyr	Pro	Glu	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Trp	Leu	Gly	Lys	Asn	Leu	Tyr
705					710					715					720
Trp	Ala	Asp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Gly
				725					730					735	
Gln	His	Arg	Gln	Val	Leu	Val	Trp	Lys	Asp	Leu	Asp	Ser	Pro	Arg	Ala
			740					745					750		
Leu	Ala	Leu	Asp	Pro	Ala	Glu	Gly	Phe	Met	Tyr	Trp	Thr	Glu	Trp	Gly
		755					760						765		

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Ser	Gln	Asn	Leu	Glu	Ile	Gln	Pro	Tyr	Asp	Leu	Ser	Ile	Asp	Ile
1010						1015					1020			
Tyr	Ser	Arg	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Asn	Val	Ile
1025						1030					1035			
Asn	Val	Thr	Arg	Leu	Asp	Gly	Arg	Ser	Val	Gly	Val	Val	Leu	Lys
1040						1045					1050			
Gly	Glu	Gln	Asp	Arg	Pro	Arg	Ala	Ile	Val	Val	Asn	Pro	Glu	Lys
1055						1060					1065			
Gly	Tyr	Met	Tyr	Phe	Thr	Asn	Leu	Gln	Glu	Arg	Ser	Pro	Lys	Ile
1070						1075					1080			
Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Asp	Gly	Thr	Glu	Arg	Glu	Val	Leu	Phe	Phe
1085						1090					1095			
Ser	Gly	Leu	Ser	Lys	Pro	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Asp	Ser	Arg	Leu
1100						1105					1110			
Gly	Lys	Leu	Phe	Trp	Ala	Asp	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Glu	Ser
1115						1120					1125			
Ser	Asp	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Leu	Glu	Asp	Ser	Asn
1130						1135					1140			
Ile	Leu	Gln	Pro	Val	Gly	Leu	Thr	Val	Phe	Glu	Asn	Trp	Leu	Tyr
1145						1150					1155			
Trp	Ile	Asp	Lys	Gln	Gln	Gln	Met	Ile	Glu	Lys	Ile	Asp	Met	Thr
1160						1165					1170			
Gly	Arg	Glu	Gly	Arg	Thr	Lys	Val	Gln	Ala	Arg	Ile	Ala	Gln	Leu
1175						1180					1185			
Ser	Asp	Ile	His	Ala	Val	Lys	Glu	Leu	Asn	Leu	Gln	Glu	Tyr	Arg
1190						1195					1200			
Gln	His	Pro	Cys	Ala	Gln	Asp	Asn	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Ile	Cys
1205						1210					1215			
Leu	Val	Lys	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Arg	Cys	Ser	Cys	Pro	Met	His
1220						1225					1230			

ES 2 414 460 T3

Leu Val 1235	Leu Leu Gln Asp Glu 1240	Leu Ser Cys Gly Glu 1245	Pro Pro Thr
Cys Ser 1250	Pro Gln Gln Phe Thr 1255	Cys Phe Thr Gly Glu 1260	Ile Asp Cys
Ile Pro 1265	Val Ala Trp Arg Cys 1270	Asp Gly Phe Thr Glu 1275	Cys Glu Asp
His Ser 1280	Asp Glu Leu Asn Cys 1285	Pro Val Cys Ser Glu 1290	Ser Gln Phe
Gln Cys 1295	Ala Ser Gly Gln Cys 1300	Ile Asp Gly Ala Leu 1305	Arg Cys Asn
Gly Asp 1310	Ala Asn Cys Gln Asp 1315	Lys Ser Asp Glu Lys 1320	Asn Cys Glu
Val Leu 1325	Cys Leu Ile Asp Gln 1330	Phe Arg Cys Ala Asn 1335	Gly Gln Cys
Ile Gly 1340	Lys His Lys Lys Cys 1345	Asp His Asn Val Asp 1350	Cys Ser Asp
Lys Ser 1355	Asp Glu Leu Asp Cys 1360	Tyr Pro Thr Glu Glu 1365	Pro Ala Pro
Gln Ala 1370	Thr Asn Thr Val Gly 1375	Ser Val Ile Gly Val 1380	Ile Val Thr
Ile Phe 1385	Val Ser Gly Thr Val 1390	Tyr Phe Ile Cys Gln 1395	Arg Met Leu
Cys Pro 1400	Arg Met Lys Gly Asp 1405	Gly Glu Thr Met Thr 1410	Asn Asp Tyr
Val Val 1415	His Gly Pro Ala Ser 1420	Val Pro Leu Gly Tyr 1425	Val Pro His
Pro Ser 1430	Ser Leu Ser Gly Ser 1435	Leu Pro Gly Met Ser 1440	Arg Gly Lys
Ser Met 1445	Ile Ser Ser Leu Ser 1450	Ile Met Gly Gly Ser 1455	Ser Gly Pro

ES 2 414 460 T3

Pro Tyr Asp Arg Ala His Val Thr Gly Ala Ser Ser Ser Ser Ser
1460 1465 1470

Ser Ser Thr Lys Gly Thr Tyr Phe Pro Ala Ile Leu Asn Pro Pro
1475 1480 1485

Pro Ser Pro Ala Thr Glu Arg Ser His Tyr Thr Met Glu Phe Gly
1490 1495 1500

Tyr Ser Ser Asn Ser Pro Ser Thr His Arg Ser Tyr Ser Tyr Arg
1505 1510 1515

Pro Tyr Ser Tyr Arg His Phe Ala Pro Pro Thr Thr Pro Cys Ser
1520 1525 1530

Thr Asp Val Cys Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Ser Arg Arg Met Thr
1535 1540 1545

Ser Val Ala Thr Ala Lys Gly Tyr Thr Ser Asp Leu Asn Tyr Asp
1550 1555 1560

Ser Glu Pro Val Pro Pro Pro Pro Thr Pro Arg Ser Gln Tyr Leu
1565 1570 1575

Ser Ala Glu Glu Asn Tyr Glu Ser Cys Pro Pro Ser Pro Tyr Thr
1580 1585 1590

Glu Arg Ser Tyr Ser His His Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Ser Pro
1595 1600 1605

Cys Thr Asp Ser Ser
1610

<210> 9
<211> 702
<212> ADN
<213> Rata

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(702)

<400> 9

atg ggt gtg cct act cat ctc ctg ggt ttg ttg ctg ctc tgg att aca 48
Met Gly Val Pro Thr His Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Ile Thr
1 5 10 15

10 cat gcc ata tgt gat atc cgg atg aca cag tct cca gct tcc ctg tct 96

ES 2 414 460 T3

His	Ala	Ile	Cys	Asp	Ile	Arg	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser		
			20					25					30				
gca	tct	ctg	gga	gaa	act	gtc	aac	atc	gaa	tgt	cta	gca	agt	gag	gac	144	
Ala	Ser	Leu	Gly	Glu	Thr	Val	Asn	Ile	Glu	Cys	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp		
		35					40					45					
att	tac	agt	gat	tta	gca	tgg	tat	cag	cag	aag	cca	ggg	aaa	tct	cct	192	
Ile	Tyr	Ser	Asp	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro		
	50					55					60						
cag	ctc	ctg	atc	tat	aat	gca	aat	agc	ttg	caa	aat	ggg	gtc	cct	tca	240	
Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asn	Ala	Asn	Ser	Leu	Gln	Asn	Gly	Val	Pro	Ser		
65					70				75					80			
cgg	ttt	agt	ggc	agt	gga	tct	ggc	aca	cag	tat	tct	cta	aaa	ata	aac	288	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn		
			85					90						95			
agc	ctg	caa	tct	gaa	gat	gtc	gcg	act	tat	ttc	tgt	caa	caa	tat	aac	336	
Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn		
		100						105					110				
aat	tat	cct	ccg	acg	ttc	ggg	gga	ggc	acc	aag	ctg	gaa	ttg	aaa	cgg	384	
Asn	Tyr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg		
		115					120						125				
gct	gat	gct	gca	cca	act	gta	tct	atc	ttc	cca	cca	tcc	acg	gaa	cag	432	
Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Thr	Glu	Gln		
		130				135					140						
tta	gca	act	gga	ggg	gcc	tca	gtc	gtg	tgc	ctc	atg	aac	aac	ttc	tat	480	
Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Met	Asn	Asn	Phe	Tyr		
145					150				155						160		
ccc	aga	gac	atc	agt	gtc	aag	tgg	aag	att	gat	ggc	act	gaa	cga	cga	528	
Pro	Arg	Asp	Ile	Ser	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Thr	Glu	Arg	Arg		
			165					170						175			
gat	ggg	gtc	ctg	gac	agt	gtt	act	gat	cag	gac	agc	aaa	gac	agc	acg	576	
Asp	Gly	Val	Leu	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr		
		180						185						190			
tac	agc	atg	agc	agc	acc	ctc	tcg	ttg	acc	aag	gct	gac	tat	gaa	agt	624	
Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Ser		
		195					200					205					
cat	aac	ctc	tat	acc	tgt	gag	gtt	gtt	cat	aag	aca	tca	tcc	tca	ccc	672	
His	Asn	Leu	Tyr	Thr	Cys	Glu	Val	Val	His	Lys	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro		
	210					215					220						
gtc	gtc	aag	agc	ttc	aac	agg	aat	gag	tgt							702	
Val	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys								
225					230												
<210>	10																
<211>	234																
<212>	PRT																
<213>	Rata																
5																	
<400>	10																

ES 2 414 460 T3

```

Met Gly Val Pro Thr His Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Ile Thr
1          5          10          15

His Ala Ile Cys Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
          20          25          30

Ala Ser Leu Gly Glu Thr Val Asn Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp
          35          40          45

Ile Tyr Ser Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
50          55          60

Gln Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser
65          70          75          80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
          85          90          95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn
          100          105          110

Asn Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
          115          120          125

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Thr Glu Gln
130          135          140

Leu Ala Thr Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Leu Met Asn Asn Phe Tyr
145          150          155          160

Pro Arg Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Arg Arg
          165          170          175

Asp Gly Val Leu Asp Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          180          185          190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr Lys Ala Asp Tyr Glu Ser
          195          200          205

His Asn Leu Tyr Thr Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser Ser Ser Pro
210          215          220

Val Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225          230

```

```

<210> 11
<211> 1395
<212> ADN
<213> Rata

```

ES 2 414 460 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1395)

<400> 11

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

ES 2 414 460 T3

Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ser	Ser	Val	Thr	
		195					200					205				
gta	ccc	tcc	agc	acc	tgg	ccc	agc	cag	acc	gtc	acc	tgc	aac	gta	gcc	672
Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	
		210					215				220					
cac	ccg	gcc	agc	agc	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	att	gtg	ccc	aga	aac	720
His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asn	
		225				230				235					240	
tgt	gga	ggt	gat	tgc	aag	cct	tgt	ata	tgt	aca	ggc	tca	gaa	gta	tca	768
Cys	Gly	Gly	Asp	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Gly	Ser	Glu	Val	Ser	
				245					250					255		
tct	gtc	ttc	atc	ttc	ccc	cca	aag	ccc	aaa	gat	gtg	ctc	acc	atc	act	816
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	
			260					265					270			
ctg	act	cct	aag	gtc	acg	tgt	gtt	gtg	gta	gac	att	agc	cag	gac	gat	864
Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Gln	Asp	Asp	
		275					280					285				
ccc	gag	gtc	cat	ttc	agc	tgg	ttt	gta	gat	gac	gtg	gaa	gtc	cac	aca	912
Pro	Glu	Val	His	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	
		290				295					300					
gct	cag	act	cga	cca	cca	gag	gag	cag	ttc	aac	agc	act	ttc	cgc	tca	960
Ala	Gln	Thr	Arg	Pro	Pro	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	
		305			310					315					320	
gtc	agt	gaa	ctc	ccc	atc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctc	aat	ggc	agg	acg	1008
Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Arg	Thr	
				325					330					335		
ttc	aga	tgc	aag	gtc	acc	agt	gca	gct	ttc	cca	tcc	ccc	atc	gag	aaa	1056
Phe	Arg	Cys	Lys	Val	Thr	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Lys	
			340					345					350			
acc	atc	tcc	aaa	ccc	gaa	ggc	aga	aca	caa	gtt	ccg	cat	gta	tac	acc	1104
Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Gln	Val	Pro	His	Val	Tyr	Thr	
		355					360					365				
atg	tca	cct	acc	aag	gaa	gag	atg	acc	cag	aat	gaa	gtc	agt	atc	acc	1152
Met	Ser	Pro	Thr	Lys	Glu	Glu	Met	Thr	Gln	Asn	Glu	Val	Ser	Ile	Thr	
		370				375					380					
tgc	atg	gta	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	cca	gac	att	tat	gtg	gag	tgg	cag	1200
Cys	Met	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Pro	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Gln	
		385			390					395					400	
atg	aac	ggg	cag	cca	cag	gaa	aac	tac	aag	aac	act	cca	cct	acg	atg	1248
Met	Asn	Gly	Gln	Pro	Gln	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Pro	Pro	Thr	Met	
				405					410					415		
gac	aca	gat	ggg	agt	tac	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	aat	gtg	aag	aag	1296
Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Lys	Lys	
			420					425				430				
gaa	aaa	tgg	cag	cag	gga	aac	acg	ttc	acg	tgt	tct	gtg	ctg	cat	gaa	1344

ES 2 414 460 T3

Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
435 440 445

ggc ctg cac aac cac cat act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt 1392
Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
450 455 460

aaa 1395
Lys
465

<210> 12
<211> 465
<212> PRT
5 <213> Rata

<400> 12

Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Ala Asn Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Thr Thr Ala
130 135 140

Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn Ser
145 150 155 160

Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys
420 425 430

Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
435 440 445

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 13
<211> 14
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> péptido PADRE
<400> 13

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Cys
1 5 10

10 <210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
15 <223> péptido PADRE

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEA
<222> (4)..(4)
<223> X = ciclohexil-alanina

20 <400> 14

Cys Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 44
<212> ARN
25 <213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido RACE
<400> 15

cgacuggagc acgaggacac ugacauggac ugaaggagua gaaa 44

30 <210> 16
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> oligonucleótido RACE

<220>
<221> característica_miscelánea

<222> (18)..(23)
 <223> N = cualquier nucleótido
 <400> 16
 ggccggatag gcctcacnnn nnnt 24
 5 <210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Cebador de PCR
 <400> 17
 cgactggagc acgaggacac tga 23
 15 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 18
 20 gcaacagtgg taggtcgctt gtgg 24
 <210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 19
 ggacactgac atggactgaa ggagta 26
 30 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 35 <400> 20
 aggagccagt ggatagacag a 21
 <210> 21
 <211> 45
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 21
 aagctcgagg tcgactagac caccatgggt gtcctactc atctc 45
 45 <210> 22
 <211> 46
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 22
 5 aagctcgagg tcgactagac caccatggac atcaggctca gcttgg 46
 <210> 23
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 23
 aaccgtttaa acgcggccgc ctaacactca ttctgttga 40
 <210> 24
 15 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 20 <400> 24
 aaccgtttaa acgcggccgc tcatttaccg ggagagtggg ag 42
 <210> 25
 <211> 642
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Quimera
 <220>
 <221> CDS
 30 <222> (1)..(642)
 <400> 25

ES 2 414 460 T3

gct att cga atg acc caa tcc ccc ttt tct ctt tcc gcc tca gtt gga	48
Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gat cgc gta acc ata acc tgc ctg gca tca gaa gac att tac agc gac	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp	
20 25 30	
ctt gca tgg tat caa caa aaa ccc gcc aaa gct ccc aaa ctt ttc atc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile	
35 40 45	
tat aac gcc aat agc ctc cag aac ggt gtt cca tcc aga ttt agc ggc	192
Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
tca gga tcc ggc aca gac tac aca ctc act att tca tca ctg caa ccc	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gac ttc gcc aca tac tac tgc caa caa tac aat aac tac ccc ccc	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro	
85 90 95	
aca ttc ggc ggc ggc act aaa gtc gaa att aaa cgt acg gtg gct gca	336
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105 110	
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga	384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
115 120 125	
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc	432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130 135 140	
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag	480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
145 150 155 160	
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc	528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
165 170 175	
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac	576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
180 185 190	
gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc	624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
195 200 205	
ttc aac agg gga gag tgt	642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210	

<210> 26
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Constructo Sintético

 <400> 26

ES 2 414 460 T3

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 27

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(321)

ES 2 414 460 T3

<400> 27

gct att cga atg acc caa tcc ccc ttt tct ctt tcc gcc tca gtt gga 48
Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gat cgc gta acc ata acc tgc ctg gca tca gaa gac att tac agc gac 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp
20 25 30

ctt gca tgg tat caa caa aaa ccc gcc aaa gct ccc aaa ctt ttc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile
35 40 45

tat aac gcc aat agc ctc cag aac ggt gtt cca tcc aga ttt agc ggc 192
Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

tca gga tcc ggc aca gac tac aca ctc act att tca tca ctg caa ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gac ttc gcc aca tac tac tgc caa caa tac aat aac tac ccc ccc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

aca ttc ggc ggc ggc act aaa gtc gaa att aaa 321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 28

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 28

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10

ES 2 414 460 T3

<210> 29
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Quimera
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(642)

10 <400> 29

gat att cga atg acc caa tcc ccc ttt tct ctt tcc gcc tca gtt gga	48
Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gat cgc gta acc ata acc tgc ctg gca tca gaa gac att tac agc gac	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp	
20 25 30	
ctt gca tgg tat caa caa aaa ccc gcc aaa gct ccc aaa ctt ttc atc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile	
35 40 45	
tat aac gcc aat agc ctc cag aac ggt gtt cca tcc aga ttt agc ggc	192

ES 2 414 460 T3

Tyr	Asn	Ala	Asn	Ser	Leu	Gln	Asn	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
50						55					60						
tca	gga	tcc	ggc	aca	gac	tac	aca	ctc	act	att	tca	tca	ctg	caa	ccc	240	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75					80		
gaa	gac	ttc	gcc	aca	tac	tac	tgc	caa	caa	tac	aat	aac	tac	ccc	ccc	288	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Pro	Pro		
				85					90					95			
aca	ttc	ggc	ggc	ggc	act	aaa	gtc	gaa	att	aaa	cgt	acg	gtg	gct	gca	336	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala		
			100					105					110				
cca	tct	gtc	ttc	atc	ttc	ccg	cca	tct	gat	gag	cag	ttg	aaa	tct	gga	384	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly		
		115					120					125					
act	gcc	tct	gtt	gtg	tgc	ctg	ctg	aat	aac	ttc	tat	ccc	aga	gag	gcc	432	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala		
			130			135					140						
aaa	gta	cag	tgg	aag	gtg	gat	aac	gcc	ctc	caa	tcg	ggg	aac	tcc	cag	480	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln		
145					150					155					160		
gag	agt	gtc	aca	gag	cag	gac	agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctc	agc	528	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser		
				165					170					175			
agc	acc	ctg	acg	ctg	agc	aaa	gca	gac	tac	gag	aaa	cac	aaa	gtc	tac	576	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr		
			180					185					190				
gcc	tgc	gaa	gtc	acc	cat	cag	ggc	ctg	agc	tcg	ccc	gtc	aca	aag	agc	624	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser		
		195					200					205					
ttc	aac	agg	gga	gag	tgt											642	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys												
																210	

<210> 30
 <211> 214
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Constructo Sintético
 <400> 30

Asp	Ile	Arg	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Phe	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	Ser	Asp
		20					25						30		

ES 2 414 460 T3

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31

<211> 321

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(321)

<400> 31

ES 2 414 460 T3

gat att cga atg acc caa tcc ccc ttt tct ctt tcc gcc tca gtt gga 48
 Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gat cgc gta acc ata acc tgc ctg gca tca gaa gac att tac agc gac 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp
 20 25 30

ctt gca tgg tat caa caa aaa ccc gcc aaa gct ccc aaa ctt ttc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile
 35 40 45

tat aac gcc aat agc ctc cag aac ggt gtt cca tcc aga ttt agc ggc 192
 Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

tca gga tcc ggc aca gac tac aca ctc act att tca tca ctg caa ccc 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gac ttc gcc aca tac tac tgc caa caa tac aat aac tac ccc ccc 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
 85 90 95

aca ttc ggc ggc ggc act aaa gtc gaa att aaa 321
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 32
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Constructo Sintético
 <400> 32

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile
 35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 33

<211> 1350
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Quimera

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1350)

<400> 33

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga gtt gta caa cct gga cga	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	
20 25 30	
gcc atg gca tgg gtt cga caa gct cct ggg aaa gga ttg gaa tgg gta	144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc	192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val	
50 55 60	
aaa gga cga ttt aca atc tca cga gat aac tct aag aat acc ctt tac	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctt caa atg aat tca ctg aga gca gaa gat acg gct gtt tat tat tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca acc gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag	336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	
100 105 110	
gga aca ttg gta acc gtc tct agt gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc	384
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	
115 120 125	
ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc	432
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala	
130 135 140	
ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg	480
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	
145 150 155 160	

10

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac 1248
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat 1296
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg 1344
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

ggt aaa 1350
 Gly Lys
 450

<210> 34

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

ES 2 414 460 T3

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

ES 2 414 460 T3

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 35

<211> 360

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(360)

<400> 35

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga gtt gta caa cct gga cga 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

gcc atg gca tgg gtt cga caa gct cct ggg aaa gga ttg gaa tgg gta 144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc 192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

aaa gga cga ttt aca atc tca cga gat aac tct aag aat acc ctt tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctt caa atg aat tca ctg aga gca gaa gat acg gct gtt tat tat tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca acc gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag 336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga aca ttg gta acc gtc tct agt 360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Constructo Sintético

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 37
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Chimera

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1350)

<400> 37

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		
225					230					235					240		
ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	768	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
				245					250					255			
tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	816	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu		
			260					265					270				
gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	864	
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
		275					280					285					
aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	912	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
	290					295					300						
gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	960	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
305					310					315					320		
gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	1008	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		
				325					330					335			
aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	1056	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		
			340					345					350				
acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	1104	
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		
		355					360					365					
acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	1152	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp		
	370					375					380						
gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	1200	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val		
385				390					395						400		
ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tat	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	1248	
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp		
				405				410						415			
aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	1296	
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His		
			420				425						430				
gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	1344	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro		
		435				440						445					
ggt	aaa															1350	
Gly	Lys																
	450																

<210> 38

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 414 460 T3

<223> Construto Sintético

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

ES 2 414 460 T3

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 39
 <211> 360

ES 2 414 460 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Quimera

5 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 39

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga gtt gta caa cct gga cga	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	
20 25 30	
gcc atg gca tgg gtt cga caa gct cct ggg aaa gga ttg gaa tgg gta	144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc	192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val	
50 55 60	
aaa gga cga ttt aca atc tca cga gat aac gct aag aat acc ctt tac	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctt caa atg aat tca ctg aga gca gaa gat acg gct aca tat tat tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca acc gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag	336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	
100 105 110	
gga aca ttg gta acc gtc tct agt	360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

10 <210> 40
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Constructo Sintético

<400> 40

ES 2 414 460 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41
<211> 1338
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Quimera

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1338)

<400> 41

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga gtt gta caa cct gga cga 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

gcc atg gca tgg gtt cga caa gct cct ggg aaa gga ttg gaa tgg gta 144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc 192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc 960
 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc 1008
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca 1056
 Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc 1104
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg 1152
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc gac 1200
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1338
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 42
 <211> 446
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Constructo Sintético
 <400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 43
<211> 360
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Quimera

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(360)

<400> 43

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga gtt gta caa cct gga cga 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

gcc atg gca tgg gtt cga caa gct cct ggg aaa gga ttg gaa tgg gta 144

ES 2 414 460 T3

Ala	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
gca	aca	att	att	tac	gat	gga	tct	tca	aca	tat	tat	cgc	gac	tct	gtc	192	
Ala	Thr	Ile	Ile	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val		
	50					55				60							
aaa	gga	cga	ttt	aca	atc	tca	cga	gat	aac	tct	aag	aat	acc	ctt	tac	240	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
65					70				75					80			
ctt	caa	atg	aat	tca	ctg	aga	gca	gaa	gat	acg	gct	gtt	tat	tat	tgt	288	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90				95				
gca	acc	gga	ctt	gga	att	gcg	act	gat	tat	ttt	gat	tat	tgg	ggc	cag	336	
Ala	Thr	Gly	Leu	Gly	Ile	Ala	Thr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln		
			100					105					110				
gga	aca	ttg	gta	acc	gtc	tct	agt									360	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115				120											

<210> 44
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Constructo Sintético

<400> 44

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
			20					25					30		

Ala	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Ala	Thr	Ile	Ile	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val
	50					55				60					

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75					80	

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		

Ala	Thr	Gly	Leu	Gly	Ile	Ala	Thr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115				120	

10

<210> 45
 <211> 1338
 <212> ADN

ES 2 414 460 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1338)

<400> 45

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

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1338
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 46

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

ES 2 414 460 T3

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
 210 215 220

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

ES 2 414 460 T3

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 47
<211> 360
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Quimera

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 47
gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga gtt gta caa cct gga cga 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
gcc atg gca tgg gtt cga caa gct cct ggg aaa gga ttg gaa tgg ctg 144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc 192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60
aaa gga cga ttt aca atc tca cga gat aac tct aag aat acc ctt tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
ctt caa atg aat tca ctg aga gca gaa gat acg gct gtt tat tat tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gca acc gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag 336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
gga aca ttg gta acc gtc tct agt 360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 120
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo Sintético

<400> 48

ES 2 414 460 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49
<211> 1338
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Quimera

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 49

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga gtt gta caa cct gga cga 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

ES 2 414 460 T3

gcc atg gca tgg gtt cga caa tct cct aag aaa gga ttg gaa tgg ctg Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Leu 35 40 45	144
gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val 50 55 60	192
aaa gga cga ttt aca atc tca cga gat aac tct aag aat acc ctt tac Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	240
ctt caa atg aat tca ctg aga gca gaa gat acg gct gtt tat tat tgt Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gca acc gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 110	336
gga aca ttg gta acc gtc tct agt gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val 115 120 125	384
ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg agc acc tcc gag agc aca gcg gcc Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala 130 135 140	432
ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser 145 150 155 160	480
tgg aac tca ggc gct ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc cca gct gtc Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val 165 170 175	528
cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro 180 185 190	576
tcc agc aac ttc ggc acc cag acc tac acc tgc aac gta gat cac aag Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys 195 200 205	624
ccc agc aac acc aag gtg gac aag aca gtt gag cgc aaa tgt tgt gtc Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val 210 215 220	672
gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga ccg tca gtc ttc Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe 225 230 235 240	720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255	768
gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac ccc gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270	816

ES 2 414 460 T3

cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca	864
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	
275 280 285	
aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt gtg gtc agc gtc	912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val	
290 295 300	
ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc	960
Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	
305 310 315 320	
aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc	1008
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	
325 330 335	
aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca	1056
Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	
340 345 350	
tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc	1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	
355 360 365	
aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg	1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	
370 375 380	
cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc gac	1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp	
385 390 395 400	
ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg	1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	
405 410 415	
cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac	1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	
420 425 430	
aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
435 440 445	

<210> 50

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 51
<211> 360
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Quimera

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(360)

<400> 51

gaa gta çag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga gtt gta caa cct gga cga 48

ES 2 414 460 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5				10						15		
tca	ctt	aga	ctt	tct	tgc	gct	gca	agc	gga	ttt	aca	ttt	tca	gat	tac	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	
			20					25					30			
gcc	atg	gca	tgg	gtt	cga	caa	tct	cct	aag	aaa	gga	ttg	gaa	tgg	ctg	144
Ala	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Lys	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	
		35					40					45				
gca	aca	att	att	tac	gat	gga	tct	tca	aca	tat	tat	cgc	gac	tct	gtc	192
Ala	Thr	Ile	Ile	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aaa	gga	cga	ttt	aca	atc	tca	cga	gat	aac	tct	aag	aat	acc	ctt	tac	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70				75					80		
ctt	caa	atg	aat	tca	ctg	aga	gca	gaa	gat	acg	gct	gtt	tat	tat	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85				90					95			
gca	acc	gga	ctt	gga	att	gcg	act	gat	tat	ttt	gat	tat	tgg	ggc	cag	336
Ala	Thr	Gly	Leu	Gly	Ile	Ala	Thr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100					105					110			
gga	aca	ttg	gta	acc	gtc	tct	agt									360
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		115					120									

<210> 52
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Constructo Sintético
 <400> 52

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

ES 2 414 460 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 1338
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Quimera

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 53

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga ctt gta caa cct gca cga 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Arg
1 5 10 15

tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

gcc atg gca tgg gtt cga caa tct cct aag aaa gga ttg gaa tgg tta 144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc 192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

aaa gga cga ttt aca atc tca cga gat aac gtt aag aat acc ctt tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctt caa atg gac tca ctg aga tcc gaa gat acg gct aca tat tat tgt 288
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aca gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag 336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga aca ttg gta acc gtc tct agt gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc 384
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg agc acc tcc gag agc aca gcg gcc 432

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc gac 1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 54

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

ES 2 414 460 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
 210 215 220
 Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

ES 2 414 460 T3

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 55

<211> 360

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(360)

<400> 55

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga ctt gta caa cct gca cga 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Arg
1 5 10 15

tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

gcc atg gca tgg gtt cga caa tct cct aag aaa gga ttg gaa tgg tta 144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc 192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

aaa gga cga ttt aca atc tca cga gat aac gtt aag aat acc ctt tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctt caa atg gac tca ctg aga tcc gaa gat acg gct aca tat tat tgt 288
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aca gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag 336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga aca ttg gta acc gtc tct agt 360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Constructo Sintético

 <400> 56

 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Arg
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

 Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

 Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 57
 <211> 1338
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Quimera

 <220>
 15 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)

 <400> 57

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct	768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	
245 250 255	
gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac ccc gag gtc	816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val	
260 265 270	
cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca	864
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	
275 280 285	
aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt gtg gtc agc gtc	912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val	
290 295 300	
ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc	960
Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	
305 310 315 320	
aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc	1008
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	
325 330 335	
aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca	1056
Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	
340 345 350	
tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc	1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	
355 360 365	
aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg	1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	
370 375 380	
cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc gac	1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp	
385 390 395 400	
ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg	1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	
405 410 415	
cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac	1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	
420 425 430	
aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
435 440 445	

<210> 58
 <211> 446
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Constructo Sintético

 <400> 58

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

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

<210> 59
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Chimera

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 59

ES 2 414 460 T3

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg tgg gga ctt gta caa cct gca aac	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Trp Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn	
1 5 10 15	
tca ctt aaa ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac	96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	
20 25 30	
gcc atg gca tgg gtt cga caa tct cct aag aaa gga ttg gaa tgg tta	144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
35 40 45	
gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc	192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val	
50 55 60	
aaa gga cga ttt aca atc tca cga gat aac gtt aag aat acc ctt tac	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctt caa atg gac tca ctg aga tcc gaa gat acg gct aca tat tat tgt	288
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aca gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag	336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	
100 105 110	
gga gtt ttg gta acc gtc tct agt	360
Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

<210> 60

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Trp Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

ES 2 414 460 T3

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 61
<211> 1338
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Chimera

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 61
gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga ctt gta caa cct gca aac 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn
1 5 10 15
tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
gcc atg gca tgg gtt cga caa tct cct aag aaa gga ttg gaa tgg gta 144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc 192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60
aaa gga cga ttt aca atc tca cga gat aac gct aag agc acc ctt tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80
ctt caa atg gac tca ctg aga gca gaa gat acg gct gtt tat tat tgt 288
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gca aca gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag 336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc 1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg 1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc gac 1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 62

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

ES 2 414 460 T3

Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
 210 215 220

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

ES 2 414 460 T3

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 63
<211> 360
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Chimera

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 63

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga ctt gta caa cct gca aac 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn
1 5 10 15

tca ctt aga ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

gcc atg gca tgg gtt cga caa tct cct aag aaa gga ttg gaa tgg gta 144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc 192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

aaa gga cga ttt aca atc tca cga gat aac gct aag agc acc ctt tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctt caa atg gac tca ctg aga gca gaa gat acg gct gtt tat tat tgt 288

ES 2 414 460 T3

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aca gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag 336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga gtt ttg gta acc gtc tct agt 360
Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 65

<211> 1338

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Chimera

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1338)

<400> 65

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val		
210						215					220						
gag	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cca	cct	gtg	gca	gga	ccg	tca	gtc	ttc	720	
Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
225					230					235					240		
ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	768	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro		
				245					250					255			
gag	gtc	acg	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	ccc	gag	gtc	816	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val		
			260					265					270				
cag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	864	
Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr		
		275					280					285					
aag	cca	cgg	gag	gag	cag	ttc	aac	agc	acg	ttc	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	912	
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val		
	290					295					300						
ctc	acc	gtt	gtg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aac	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	960	
Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys		
305					310					315					320		
aag	gtc	tcc	aac	aaa	ggc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	1008	
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser		
				325					330					335			
aaa	acc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	1056	
Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro		
			340					345					350				
tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	1104	
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val		
		355					360					365					
aaa	ggc	ttc	tac	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	1152	
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly		
	370					375					380						
cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	aca	cct	ccc	atg	ctg	gac	tcc	gac	1200	
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp		
385					390					395					400		
ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	1248	
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp		
				405					410					415			
cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	1296	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His		
			420					425					430				
aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa			1338	
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
		435					440					445					

<210> 66
 <211> 446
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>

ES 2 414 460 T3

<223> Constructo Sintético

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Lys Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

ES 2 414 460 T3

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
210 215 220

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 67

<211> 360

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Chimera

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

5 <400> 67

gaa gta cag ttg gtc gaa agt ggg ggg gga ctt gta caa cct gga cga 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tca ctt aaa ctt tct tgc gct gca agc gga ttt aca ttt tca gat tac 96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

gcc atg gca tgg gtt cga caa tct cct aag aaa gga ttg aaa tgg gta 144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Lys Trp Val
35 40 45

gca aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc 192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

aaa gga cga ttt aca atc tca cga aat aac gct aag aat acc ctt tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctt caa atg aat tca ctg aga tcc gaa gat acg gct gtt tat tat tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aca gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat tgg ggc cag 336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga gtt ttg gta acc gtc tct agt 360
Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

ES 2 414 460 T3

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Lys Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
<211> 33
<212> ADN
5 <213> Rattus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(33)
<400> 69

ctg gca tca gaa gac att tac agc gac ctt gca 33
Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp Leu Ala
10 1 5 10

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 70
Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 71
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Rattus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(21)
<400> 71

aac gcc aat agc ctc cag aac 21
Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn
25 1 5

<210> 72

```

<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 72

Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn
5 1 5

<210> 73
<211> 27
<212> ADN
<213> Rattus sp.

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(27)

<400> 73

caa caa tac aat aac tac ccc ccc aca
Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro Thr
1 5

15 <210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 74

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro Thr
20 1 5

<210> 75
<211> 15
<212> ADN
<213> Rattus sp.

25 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(15)

<400> 75

gat tac gcc atg gca
Asp Tyr Ala Met Ala
30 1 5

<210> 76
<211> 5
<212> PRT
<213> Rattus sp.

35 <400> 76

Asp Tyr Ala Met Ala
1 5

<210> 77
<211> 51
<212> ADN
40 <213> Rattus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(51)

<400> 77

```

27

15

ES 2 414 460 T3

```

aca att att tac gat gga tct tca aca tat tat cgc gac tct gtc aaa      48
Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1           5           10           15

gga                                                                    51
Gly

<210> 78
<211> 17
<212> PRT
5 <213> Rattus sp.

<400> 78

Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1           5           10           15

Gly

<210> 79
<211> 33
10 <212> ADN
    <213> Rattus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(33)

15 <400> 79

gga ctt gga att gcg act gat tat ttt gat tat      33
Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1           5           10

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Rattus sp.

<400> 80

Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1           5           10

<210> 81
<211> 642
25 <212> ADN
    <213> Rattus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(642)

30 <400> 81

```

ES 2 414 460 T3

gat atc cgg atg aca cag tct cca gct tcc ctg tct gca tct ctg gga Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly 1 5 10 15	48
gaa act gtc aac atc gaa tgt cta gca agt gag gac att tac agt gat Glu Thr Val Asn Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp 20 25 30	96
tta gca tgg tat cag cag aag cca ggg aaa tct cct cag ctc ctg atc Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile 35 40 45	144
tat aat gca aat agc ttg caa aat ggg gtc cct tca cgg ttt agt ggc Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60	192
agt gga tct ggc aca cag tat tct cta aaa ata aac agc ctg caa tct Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser 65 70 75 80	240
gaa gat gtc gcg act tat ttc tgt caa caa tat aac aat tat cct ccg Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro 85 90 95	288
acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa ttg aaa cgg gct gat gct gca Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala 100 105 110	336
cca act gta tct atc ttc cca cca tcc acg gaa cag tta gca act gga Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Thr Glu Gln Leu Ala Thr Gly 115 120 125	384
ggg gcc tca gtc gtg tgc ctc atg aac aac ttc tat ccc aga gac atc Gly Ala Ser Val Val Cys Leu Met Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile 130 135 140	432
agt gtc aag tgg aag att gat ggc act gaa cga cga gat ggt gtc ctg Ser Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Arg Arg Asp Gly Val Leu 145 150 155 160	480
gac agt gtt act gat cag gac agc aaa gac agc acg tac agc atg agc Asp Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser 165 170 175	528
agc acc ctc tcg ttg acc aag gct gac tat gaa agt cat aac ctc tat Ser Thr Leu Ser Leu Thr Lys Ala Asp Tyr Glu Ser His Asn Leu Tyr 180 185 190	576
acc tgt gag gtt gtt cat aag aca tca tcc tca ccc gtc gtc aag agc Thr Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser Ser Ser Pro Val Val Lys Ser 195 200 205	624
ttc aac agg aat gag tgt Phe Asn Arg Asn Glu Cys 210	642

<210> 82
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 82

ES 2 414 460 T3

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Asn Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Thr Glu Gln Leu Ala Thr Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Leu Met Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile
130 135 140

Ser Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Arg Arg Asp Gly Val Leu
145 150 155 160

Asp Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Ser Leu Thr Lys Ala Asp Tyr Glu Ser His Asn Leu Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser Ser Ser Pro Val Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 83
<211> 321
5 <212> ADN
<213> Rattus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

10 <400> 83

ES 2 414 460 T3

gat atc cgg atg aca cag tct cca gct tcc ctg tct gca tct ctg gga 48
 Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

gaa act gtc aac atc gaa tgt cta gca agt gag gac att tac agt gat 96
 Glu Thr Val Asn Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp
 20 25 30

tta gca tgg tat cag cag aag cca ggg aaa tct cct cag ctc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45

tat aat gca aat agc ttg caa aat ggg gtc cct tca cgg ttt agt ggc 192
 Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggc aca cag tat tct cta aaa ata aac agc ctg caa tct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

gaa gat gtc gcg act tat ttc tgt caa caa tat aac aat tat cct ccg 288
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
 85 90 95

acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa ttg aaa 321
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 84
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 84

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Asn Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 85
 <211> 33
 <212> ADN

<213> Rattus sp.
 <400> 85
 ctagcaagtg aggacattta cagtgattta gca 33
 5 <210> 86
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.
 <400> 86
 aatgcaaata gcttgcaaaa t 21
 10 <210> 87
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.
 <400> 87
 15 caacaatata acaattatcc tccgacg 27
 <210> 88
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.
 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)
 <400> 88

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

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

ES 2 414 460 T3

Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
420 425 430

aac cac cat act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa 1338
Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 89
<211> 446
<212> PRT
5 <213> Rattus sp.

<400> 89

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Thr Thr Ala Pro Ser Val
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn Ser Met Val Thr
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Thr Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

ES 2 414 460 T3

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
195 200 205

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly
210 215 220

Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe
225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
245 250 255

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val
260 265 270

His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
275 280 285

Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
290 295 300

Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys
305 310 315 320

Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro
340 345 350

Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp
385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 90

ES 2 414 460 T3

<211> 360
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<220>

5 <221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 90

gag gta cag ctg gtg gag tct ggc gga gga ttg gta cag cct gca aac	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn	
1 5 10 15	

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tca gga ttc act ttc agt gac tat	96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	
20 25 30	

gcc atg gcc tgg gtc cgc cag tct cca aag aag ggt ctg gag tgg gtc	144
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	

gca acc att att tat gat ggt agt agc act tac tat cga gac tcc gtg	192
Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val	
50 55 60	

aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat gca aaa agc acc cta tac	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	

ctg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	
85 90 95	

gca aca ggt ctg ggt ata gct acg gac tac ttt gat tac tgg ggc caa	336
Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	
100 105 110	

gga gtc ctg gtc aca gtc tcc tca	360
Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

<210> 91
10 <211> 120
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 91

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn
1 5 10 15

ES 2 414 460 T3

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 92
<211> 15
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 92
gactatgccca tggcc 15

<210> 93
<211> 51
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 93
accattattt atgatggtag tagcacttac tatcgagact ccgtgaaggg c 51

<210> 94
<211> 33
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 94
ggtctgggta tagctacgga ctacttgat tac 33

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo que se une específicamente a una proteína Dkk-1 humana madura, que consiste en los aminoácidos 32-266 del SEQ ID NO: 2, en donde dicho anticuerpo se une a un epítipo que comprende dos bucles, estando formados dichos bucles por enlaces disulfuro y encontrándose dichos bucles entre 220 y 237 del SEQ ID NO: 2 y entre los residuos de cisteína 245 y 263 del SEQ ID NO: 2.
2. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional se une a dos regiones separadas localizadas entre los aminoácidos 221-262 del SEQ ID NO: 2.
3. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional se une a dos regiones separadas, en donde una región consiste en los aminoácidos 221-236 del SEQ ID NO: 2 y la segunda región consiste los aminoácidos 246-262 del SEQ ID NO: 2.
4. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional de la reivindicación 2, en donde una región consiste en los aminoácidos 221-229 del SEQ ID NO: 2 y la segunda región consiste en los aminoácidos 246-253 del SEQ ID NO: 2.
5. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende:
 - (a)
 - (i) una CDR1 de LC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 70; y
 - (ii) una CDR2 de LC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 72; y
 - (iii) una CDR3 de LC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 74; y
 - (b)
 - (i) una CDR1 de HC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 76; y
 - (ii) una CDR2 de HC con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 78; y
 - (iii) una CDR3 de HC la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 80.
6. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que consiste en dos VH idénticas y dos VL idénticas.
7. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que consiste en dos VH idénticas y dos VL idénticas, en donde
 - la VL tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 84; y
 - la VH la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NIO: 91.
8. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional de la reivindicación 7, que comprende
 - una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 82; y
 - una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 89.
9. Un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo que compite con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, por la unión específica a un polipéptido Dkk-1.
10. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional de la reivindicación 9, que compite con un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, en el que dichas cadenas pesadas consisten en los aminoácidos 20-465 del SEQ ID NO: 12 y dichas cadenas ligeras consisten en los aminoácidos 21-234 del SEQ ID NO: 10.
11. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional de la reivindicación 10, que se disocia del polipéptido Dkk-1 con una k_d de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos.
12. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que es un anticuerpo monoclonal.

13. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que es un scFv, un Fab, un Fab' o un (Fab')₂.
14. El anticuerpo aislado o fragmento inmunológicamente funcional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo humanizado.
- 5 15. Un ácido nucleico que codifica
- (A) una CDR de la cadena ligera con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 70, 72 y/o 74, y/o
- (B) una CDR de la cadena pesada con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 76, 78 y/o 80,
- en donde el ácido nucleico codifica un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 10 16. Un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica la VH, la VL o tanto la VH como la VL del anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
17. Un ácido nucleico que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica la VH, la VL o tanto la VH como la VL del anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo de la reivindicación 7.
18. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 16.
19. Una célula aislada que comprende el vector de expresión de la reivindicación 18.
- 15 20. Un método de producción de un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, que comprende la etapa de cultivar una célula de acuerdo con la realización 19.
21. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un componente seleccionado del grupo que consiste de un tampón, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un portador, un solubilizante, un emulsionante y un conservante.
- 20 22. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para su uso en un método para reparar hueso o para tratar una enfermedad, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en artritis, un trastorno óseo y un cáncer que aumenta la actividad de los osteoclastos e induce la resorción ósea.
- 25 23. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la enfermedad se selecciona entre artritis reumatoide, artritis soriásica, y osteoartritis.
24. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en osteopenia, osteoporosis, enfermedad de Paget, espondilitis anquilosante, periodontitis, reparación de hueso, pérdida de hueso debida a inmovilización o metástasis óseas líticas.
- 30 25. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la reparación de hueso es el tratamiento de una fractura ósea.
26. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el anticuerpo estimula la actividad de los osteoblastos y aumenta la densidad mineral ósea o la masa ósea.
- 35 27. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el tratamiento es una terapia combinada que comprende la administración del anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo combinado con un agente promotor del crecimiento óseo o un agente anti-resorción ósea.
28. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el agente promotor del crecimiento óseo o agente anti-resorción ósea se selecciona del grupo que consiste en factor morfogénico óseo BMP-1 a BMP-12, factor de crecimiento transformante β , factores de crecimiento de fibroblastos FGF-1 a FGF-10, un inhibidor de interleucina 1, un inhibidor de TNF α , un inhibidor de ligando RANK, hormona paratiroidea, una prostaglandina de la serie E, un bisfosfonato, un mineral potenciador de hueso, y un agente anabólico.
- 40 29. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 28, en donde
- (a) el inhibidor de interleucina 1 es IL-1ra, un anticuerpo para IL-1 o un anticuerpo para receptores de IL-1,
- (b) el inhibidor de TNF α es etanercept, adalimumab o infliximab;
- 45 (c) el inhibidor del ligando RANK es RANK soluble, osteoprotegerina o un anticuerpo antagónico que se une específicamente a RANK o ligando de RANK;
- (d) el mineral potenciador de hueso es fluoruro o calcio.

30. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para su uso en un método para tratar a un paciente con cáncer que experimenta terapia de radiación o quimioterapia.
- 5 31. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo se administra combinado con una antraciclina, taxol, tamoxifeno, doxorubicina, 5-fluorouracilo, oxaloplatino, o ácido [(1R)-3-metil-1-[[[(2S)-1-oxo-3-fenil-2-[(pirazinilcarbonil)amino]propil]amino]butil]borónico).
- 10 32. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 30 o 31, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo se administra combinado con un inhibidor de aromataza y un agente quimioterapéutico para pacientes con cáncer de mama.
33. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo se administra combinado con un anticuerpo que se une a células tumorales e induce un efecto citotóxico y/o citostático sobre el crecimiento del tumor.
- 15 34. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 33, en donde el anticuerpo que induce un efecto citotóxico y/o citostático sobre el crecimiento del tumor es un anticuerpo que se une a proteínas de la superficie celular HER2, CDC20, CDC33, glicoproteína de tipo mucina o receptor del factor de crecimiento epidérmico.
- 20 35. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo se administra combinado con un polipéptido que induce selectivamente la apoptosis en células tumorales.
36. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el polipéptido es TRAIL.
37. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 y 30, y la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23-29 y 31-36, en donde la terapia combinada incluye tratamientos que se administran simultáneamente o sucesivamente.
- 25 38. La composición farmacéutica de una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el mieloma múltiple.

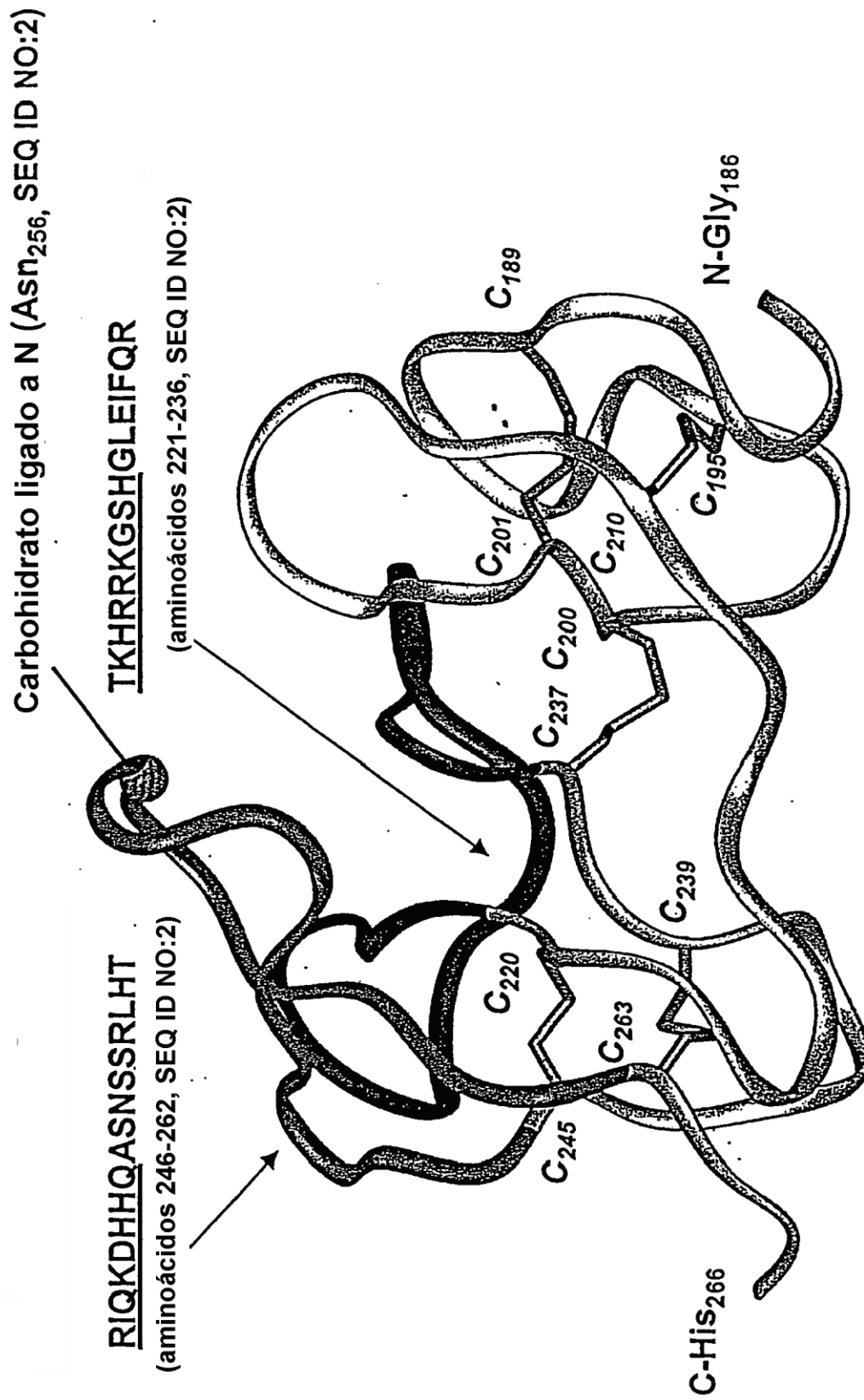


FIG. 1

FIG. 2A

Fémur Esponjoso Distal
Número Trabecular

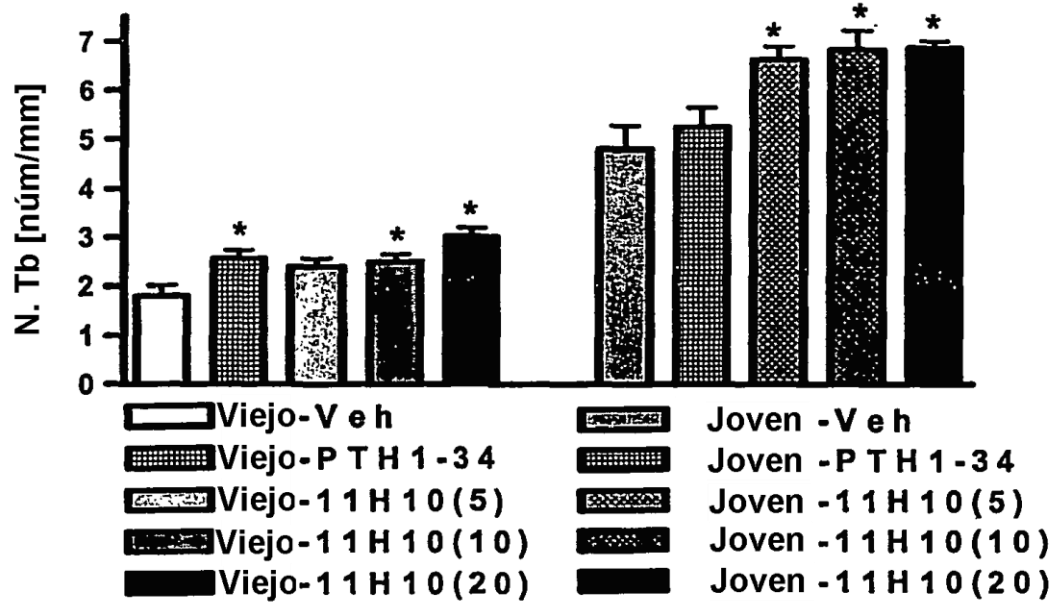


FIG. 2B

Diáfisis Fémur Sección Media
Perímetro Endosteal

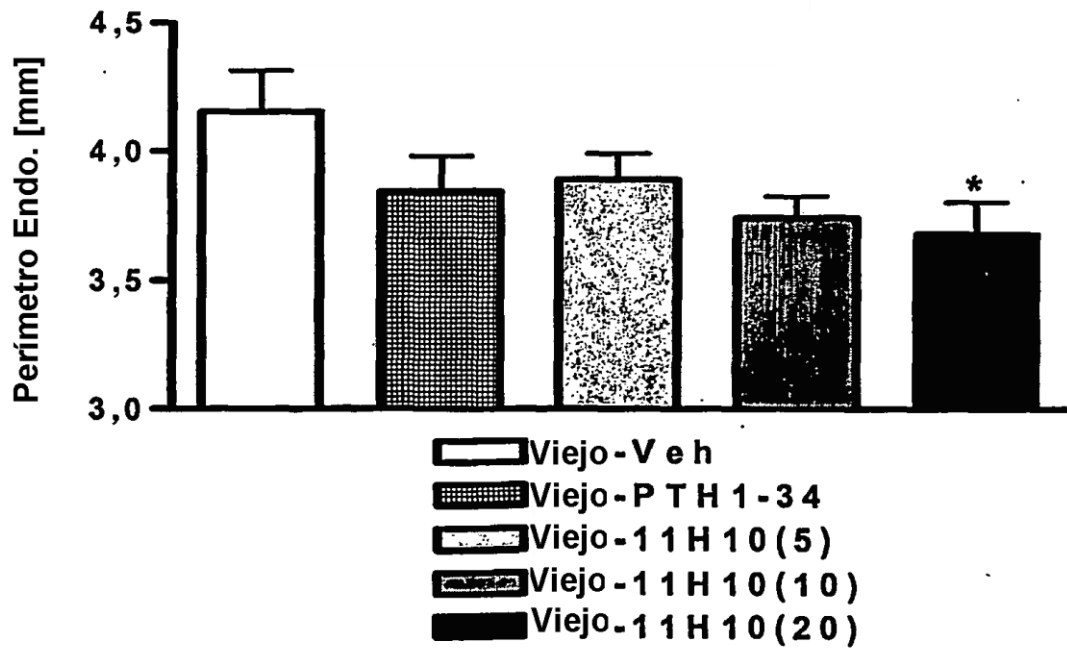


FIG. 3A

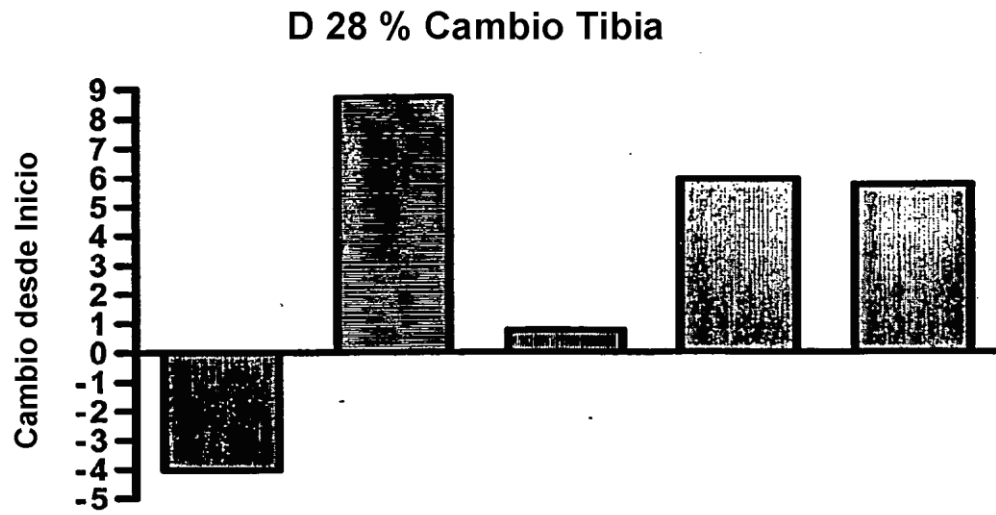
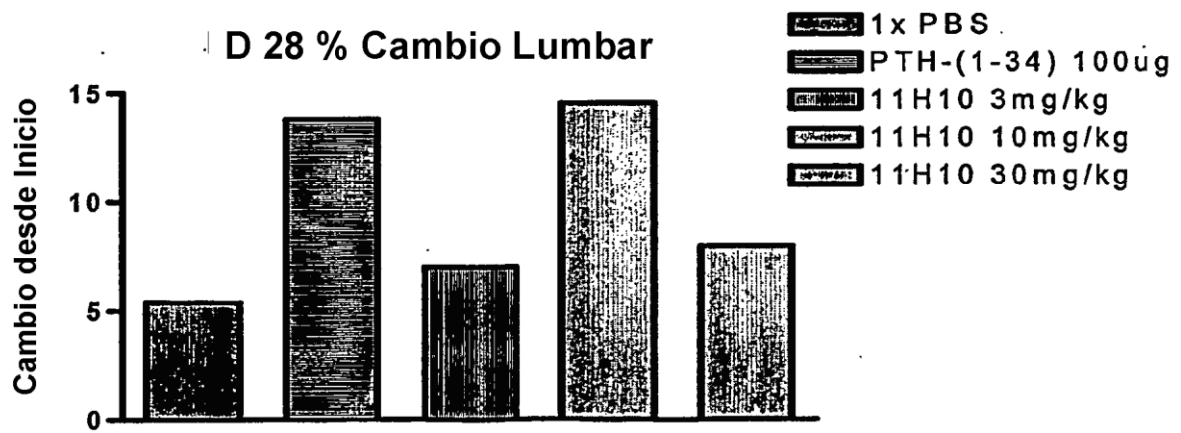


FIG. 3B



**FIG. 4: Porcentaje de Cambio en DMO en ratones tratados con h11H10 R94T
Semana 3 % Cambio en Tibia**

