

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 466**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2006 E 06836213 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 1948219**

54 Título: **Análogos de VEGF y métodos de uso**

30 Prioridad:

06.10.2005 US 723917 P
25.05.2006 US 808106 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2015

73 Titular/es:

TROPHOGEN, INC. (100.0%)
9714 Medical Center Drive, Suite 1114
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

SZKUDLINSKI, MARIUSZ W. y
WEINTRAUB, BRUCE D.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 533 466 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

Análogos de VEGF y métodos de uso

Campo de la invención

- 5 Esta solicitud se refiere al diseño y uso de análogos del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como antagonistas del receptor de VEGF para inhibir o reducir la angiogénesis para el tratamiento de afecciones y enfermedades asociadas con angiogénesis. La solicitud también describe análogos de VEGF que muestran afinidad de unión aumentada al receptor para receptores nativos tales como KDR.

Antecedentes de la invención

- 10 Los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) regulan el desarrollo de vasos sanguíneos y linfáticos. Se producen predominantemente por células endoteliales, hematopoyéticas y estromáticas en respuesta a hipoxia y estimulación con factores de crecimiento tales como factores de crecimiento transformante, interleuquinas y factor de crecimiento derivado de plaquetas.

- 15 En mamíferos, los VEGF están codificados por una familia de genes e incluyen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y factor de crecimiento tipo placentario (PlGF). Proteínas altamente relacionadas incluyen proteínas tipo VEGF codificadas por virus *orf* mencionadas como VEGF-E y una serie de venenos de serpiente mencionados como VEGF-F. Los VEGF y proteínas relacionadas con VEGF son miembros de la superfamilia génica de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) de factores de crecimiento de nudo de cistina. Todos los miembros de la superfamilia génica de PDGF comparten un alto grado de homología estructural con PDGF (véase la solicitud de patente de Estados Unidos 09/813.398).

- 20 VEGF-A, VEGF-B y PlGF son predominantemente necesarios para la formación de vasos sanguíneos, mientras que VEGF-C y VEGF-D son esenciales para la formación de vasos linfáticos. La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos y vasos linfáticos por desarrollo desde vasos preexistentes. El proceso se inicia cuando los VEGF se unen a receptores en células endoteliales, la activación de la señalización de las células endoteliales. Las células endoteliales activadas producen enzimas que disuelven orificios diminutos en la membrana vasal que rodea los vasos existentes. Las células endoteliales entonces empiezan a proliferar y migrar a través de los orificios disueltos de los vasos existentes para formar nuevos tubos vasculares (Alberts *et al*, 1994, Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., Nueva York, N.Y. 1294 pp.).

- 25 Se activan tres receptores tirosina quinasa tipo III por los VEGF durante la angiogénesis: tirosina quinasa tipo-*fms* (Flt-1, también conocido como VEGFR1), el receptor de dominio quinasa o receptor que contiene dominio de inserción quinasa (KDR, también conocido como VEGFR2 y Flk-1) y Flt-4 (también conocido como VEGFR3). El KDR es el receptor predominante en la señalización angiogénica, mientras que Flt-1 está asociado con la regulación de morfogénesis de vasos sanguíneos y Flt-4 regula la linfangiogénesis. Estos receptores se expresan casi exclusivamente en células endoteliales, con unas pocas excepciones tales como la expresión de Flt-1 en monocitos donde media la quimiotaxis (Barleon *et al.*, 1996, Blood. 87: 3336-3343).

- 35 Los receptores de VEGF están muy relacionados con los Fms, Kit y receptores de PDGF. Consisten en siete dominios tipo inmunoglobulina (Ig) extracelulares, un dominio transmembrana (TM), un dominio yuxtamembrana regulador, un dominio tirosina quinasa intracelular interrumpido por un péptido corto, el dominio de inserción quinasa, seguido por una secuencia que porta varios restos de tirosina implicados en el reclutamiento de moléculas de señalización cadena abajo. El análisis de mutaciones de los dominios extracelulares de Flt-1 y KDR muestra que el segundo y tercer dominio tipo Ig constituyen el dominio de unión a ligando de alta afinidad para VEGF regulando aparentemente el primer y cuarto dominio Ig la unión a ligando y la dimerización del receptor, respectivamente (Davis-Smyth *et al*, 1998, J. Biol. Chem. 273: 3216-3222; Fuh *et al*, 1998, J. Biol. Chem. 273: 11197-11204; y Shinkai *et al*, 1998, J. Biol. Chem. 273: 31283-31288). Los receptores tirosina quinasa se activan tras la dimerización del receptor mediada por ligando (Hubbard, 1991, Prog. Biophys. Mol. Biol. 71: 343-358; Jiang y Hunter, 1999, Curr. Biol. 9: R568-R571; y Lemmon y Schlessinger, 1998, Methods Mol. Biol. 84: 49-71). La especificidad de la señal de los receptores de VEGF se modula adicionalmente tras el reclutamiento de co-receptores, tales como neuropilinas, sulfato de heparina, integrinas o caderinas.

- 40 Las moléculas VEGF interaccionan con uno o más receptores tirosina quinasa durante la angiogénesis. Por ejemplo, VEGF-A actúa predominantemente a través de KDR y Flt-1. VEGF-C y VEGF-D asimismo son ligandos específicos para KDR y VEGFR3. Se cree que PlGF y VEGF-B se unen solamente a Flt-1. Variantes virales de VEGF-E activan KDR. Variantes de VEGF-F interaccionan con VEGFR3 o KDR.

- 45 Además de los dos receptores clásicos, hay varios receptores de membrana o solubles que modulan la bioactividad de VEGF y la angiogénesis. Por ejemplo, la neuropilina-1 y la neuropilina-2 interaccionan tanto con KDR como con Flt-1, respectivamente, estimulando la señalización de esos receptores. Se ha demostrado que isoformas de VEGF-A, VEGF-B, PlGF-2 se unen a neuropilina-1 (Soker *et al*, 1998, Cell. 92: 735-745; Makinen *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 274: 21217-21222; y Migdal *et al*, 1998, J. Biol. Chem. 273: 22272-22278). Isoformas de VEGF capaces de interaccionar con neuropilina, es decir, aquellas isoformas con el exón 7 ó 6 y 7, también son capaces de

interaccionar con sulfato de heparina.

Aunque VEGF-A es la mejor caracterizada de las proteínas VEGF, la base molecular de la interacción entre VEGF-A y KDR y Flt-1 aún no está bien comprendida. Aunque VEGFR1 se une a VEGF-A con una afinidad 50 veces mayor que KDR, KDR se considera que es el mayor transductor de efectos angiogénicos de VEGF-A, es decir, mitogenicidad, quimiotaxis e inducción de formación de tubos (Binetruy-Tourniere *et al.*, supra). Hay, sin embargo, evidencias crecientes de que Flt-1 tiene un papel significativo en la hematopoyesis y en el reclutamiento de monocitos y otras células derivadas de médula ósea que puede centrarse en la vasculatura tumoral y promover la angiogénesis (Hattori *et al.*, 2002, *Nature Med.* 8: 841-849; Gerber *et al.*, 2002, *Nature*. 417: 954-958; y Luttun *et al.*, 2002, *Nature Med.* 8: 831-840). Además, en algunos casos se expresa Flt-1 por células tumorales y puede mediar una señal quimiotáctica, extendiendo de este modo potencialmente el papel de este receptor en crecimiento canceroso (Wey *et al.*, 2005, *Cancer*. 104: 427-438).

Un único homodímero VEGF-A induce la dimerización de dos receptores KDR y la autofosforilación de sus partes citoplasmáticas. Estudios previos sugirieron que por analogía a hormonas glucoprotéicas, los restos de aminoácidos cargados en los bucles periféricos de VEGF-A también son críticos para proporcionar interacciones electrostáticas de alta afinidad con sus receptores específicos (Szkudlinski *et al.*, 1996, *Nat. Biotechnol.* 14(10): 1257-63; Fuh *et al.*, supra; Muller *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(14): 7192-7; Keyt *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271(10): 5638-46). Sin embargo, debe apreciarse que muchas mutaciones en VEGF-A no tienen efecto principal sobre la afinidad de unión del receptor. Mutaciones en los bucles periféricos de VEGF principalmente han provocado pérdida de función. Además, parece no haber sustituciones previas de aminoácidos que aumenten la afinidad de unión de KDR más de 2 veces.

La angiogénesis es responsable de eventos biológicos beneficiosos tales como curación de heridas, reparación de infarto de miocardio, y ovulación. Por otro lado, la angiogénesis también es responsable de causar o contribuir a enfermedades tales como crecimiento y metástasis de tumores sólidos (Isayeva *et al.*, 2004, *Int. J. Oncol.* 25(2):335-43; Takeda *et al.*, 2002, *Ann Surg. Oncol.* 9(7):610-16); aterosclerosis; neovascularización anormal del ojo observada en enfermedades tales como retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, oclusión de la vena retiniana, y degeneración macular relacionada con la edad (Yoshida *et al.*, 1999, *Histol Histopathol.* 14(4): 1287-94; Aiello, 1997, *Ophthalmic Res.* 29(5):354-62); afecciones inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, osteoartritis, y artritis séptica; enfermedad neurodegenerativa (Ferrara, N., 2004, *Endocr. Rev.* 25: 581-611); insuficiencia placentaria, es decir, preclamsia (Ferrara, supra); y enfermedades cutáneas tales como dermatitis, psoriasis, verrugas, malignidad cutánea, úlceras de decúbito, úlceras por estasis, granulomas piogénicos, hemangiomas, sarcoma de Kaposi, cicatrices hipertróficas, y queloides (Arbiser, 1996, *J. Am. Acad. Dermatol.* 34(3):486-97). Durante artritis reumatoide, por ejemplo, las células endoteliales llegan a activarse y expresar moléculas de adhesión y quimioquinas, lo que conduce a migración de leucocitos desde la sangre al tejido. La permeabilidad de la célula endotelial aumenta, conduciendo a formación de edema e hinchamiento de las articulaciones (Middleton *et al.*, 2004, *Arthritis Res. Ther.* 6(2):60-72).

VEGF, en particular VEGF-A, se ha implicado en muchas de las enfermedades y afecciones asociadas con angiogénesis aumentada, disminuida, y/o mal regulada (Binetruy-Tourniere *et al.*, 2000, *EMBO J.* 19(7): 1525-33). Por ejemplo, se ha implicado VEGF en la promoción de crecimiento de tumores sólidos y metástasis por estimulación de angiogénesis asociada a tumor (Lu *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 278(44): 43496-43507). VEGF también es un mediador importante de neovascularización y permeabilidad intraocular. La sobreexpresión de VEGF en ratones transgénicos provoca neovascularización clínica intra-retiniana y sub-retiniana, y la formación de vasos sanguíneos intraoculares permeables detectables por angiografía, como se observa en enfermedad ocular humana (Miller, 1997, *Am. J. Pathol.* 151(1): 13-23). Adicionalmente, se ha identificado VEGF en el fluido peritoneal de mujeres con infertilidad inexplicada y endometriosis (Miedzybrodzki *et al.*, 2001, *Ginek. Pol.* 72(5): 427-430), y se ha descubierto que la sobreexpresión de VEGF en testículos y epidídimo causa infertilidad en ratones transgénicos (Korpelainen *et al.*, 1998, *J. Cell Biol.* 143(6): 1705-1712). Recientemente, se ha identificado VEGF-A en el fluido sinovial y suero de pacientes con artritis reumatoide (RA), y su expresión está correlacionada con la severidad de la enfermedad (Clavel *et al.*, 2003, *Joint Bone Spine.* 70(5): 321-6). Dada la implicación de la angiogénesis patogénica en dicha amplia variedad de trastornos y enfermedades, la inhibición de la angiogénesis, y particularmente de la señalización de VEGF, es un objetivo terapéutico deseable.

La inhibición de la angiogénesis y la inhibición de tumores se ha conseguido usando agentes que interrumpen la interacción de VEGF-A y KDR y/o bloquean la vía de transducción de señales de KDR incluyendo: péptidos que bloquean la unión de VEGF a KDR (Binetruy-Tourniere *et al.*, 2000, *EMBO J.* 19(7): 1525-33); anticuerpos contra VEGF (Kim *et al.*, 1993, *Nature* 362, 841-844; Kanai *et al.*, 1998, *J. Cancer* 77, 933-936; Margolin *et al.*, 2001, *J. Clin. Oncol.* 19, 851-856); anticuerpos contra KDR (Lu *et al.*, 2003, supra; Zhu *et al.*, 1998, *Cancer Res.* 58, 3209-3214; Zhu *et al.*, 2003, *Leukemia* 17, 604-611; Prewett *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59, 5209-5218); receptores solubles (Holash *et al.*, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11393-11398; Clavel *et al.*, supra.); inhibidores de tirosina quinasa (Fong *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59, 99-106; Wood *et al.*, 2000, *Cancer Res.* 60, 2178-2189; Grosios *et al.*, 2004, *Inflamm. Res.* 53(4):133-42); inmunotoxinas anti-VEGF (Olson *et al.*, 1997, *Int. J. Cancer* 73, 865-870); ribozimas (Pavco *et al.*, 2000, *Clin. Cancer Res.* 6, 2094-2103); supresión de VEGF mediada por antisentido (Forster *et al.*, 2004, *Cancer Lett.* 20;212(1):95-103); interferencia de ARN (Takei *et al.*, 2004, *Cancer Res.* 64(10):3365-70; Reich *et al.*, 2003, *Mol. Vis.* 9:210-6); y heparina dividida con glicol de bajo peso molecular infrasulfatada (Pisano *et al.*, 2005, *Glycobiology*.

15(2) 1-6). El documento US-B1-6 750 044 describe un antagonista del receptor de VEGF que comprende modificaciones de aminoácidos del resto cisteína en las posiciones de aminoácido 51 y/o 60 de la secuencia nativa de aminoácidos de VEGF. Algunos de estos tratamientos sin embargo, han provocado efectos secundarios indeseables. Por ejemplo, se ha informado que la Avastatina de Genentech, un anticuerpo monoclonal dirigido a VEGF, causa un aumento en eventos tromboembólicos arteriales serios en algunos pacientes con cáncer de colon y hemoptisis severa, y en algunos casos incluso fatal, en pacientes con cáncer pulmonar no microcítico (Ratner, 2004, Nature Biotechnol. 22(10): 1198). Más recientemente, Genentech ha informado que se observaron perforaciones gastrointestinales en el 11% de las pacientes con cáncer de ovario (5 mujeres de 44 en el ensayo) tratadas con Avastatina (Genentech Press Release fechada el 23 de septiembre de 2005). Asimismo, el primer fármaco dirigido a VEGF, el inhibidor del receptor de tirosina quinasa de Pfizer SU5416, mostró toxicidades severas que incluían eventos tromboembólicos, incitando a Pfizer a interrumpir el desarrollo (Ratner, *supra*). Dada la amplia diversidad de pacientes que se beneficiarán del desarrollo de tratamientos anti-angiogénicos eficaces y los inconvenientes de algunos tratamientos anti-angiogénesis conocidos, sigue existiendo la necesidad de nuevos agentes terapéuticos anti-angiogénicos.

15 Compendio de la invención

Esta invención abarca análogos de VEGF y ácidos nucleicos que codifican los mismos, que muestran fuerte afinidad de unión por uno o más receptores nativos de VEGF en comparación con VEGF de tipo silvestre, como se define en las reivindicaciones. La invención también abarca análogos de VEGF y ácidos nucleicos que codifican los mismos, que muestran una disociación de afinidad de unión del receptor y bioactividad, como se define en las reivindicaciones. Específicamente, las bioactividades *in vivo* e *in vitro* de los análogos descritos están sustancialmente disminuidas en comparación con VEGF de tipo silvestre, mientras que la afinidad de unión al receptor KDR está sustancialmente aumentada en comparación con VEGF de tipo silvestre. Los análogos de VEGF pueden demostrar un aumento de al menos aproximadamente tres a cuatro veces en la afinidad de unión al receptor a un receptor nativo tal como KDR.

En una realización de la invención, los análogos de VEGF son homodímeros o heterodímeros de VEGF modificados. Estas moléculas contienen al menos una mutación que puede estar presente en una o ambas subunidades de la molécula VEGF. En una realización de la invención, el análogo de VEGF que contiene la una o más mutaciones es VEGF-A. El análogo de VEGF-A puede ser cualquier isoforma de VEGF-A, por ejemplo, una isoforma de 121,145, 148, 165, 183, 189, o 206 aminoácidos. En una realización, el análogo de VEGF-A de la invención es una isoforma VEGF_{165b}. En otra realización, la molécula de VEGF que contiene una o más mutaciones es VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o PIGF.

La presente invención incluye una proteína de fusión de VEGF que contiene una o más mutaciones en una o más subunidades. La proteína de fusión de VEGF de la invención incluye al menos una subunidad de VEGF, es decir, subunidad, fusionada a al menos una subunidad de una proteína diferente, incluyendo, pero sin limitarse a, otros factores de crecimiento de nudo de cistina o glucoproteínas. Por ejemplo, la invención incluye un análogo VEGF quimérico en que la molécula de VEGF contiene una subunidad de VEGF-A fusionada a una subunidad de VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, PDGF o PIGF; una subunidad de VEGF-B fusionada a una subunidad de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, PDGF o PIGF; una subunidad de VEGF-C fusionada a una subunidad de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, PDGF o PIGF; una subunidad de VEGF-D fusionada a una subunidad de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, VEGF-F, PDGF o PIGF; o una subunidad de PIGF fusionada a una subunidad de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, o PDGF. Opcionalmente las subunidades pueden estar separadas por un péptido enlazador. La invención también incluye diferentes isoformas del mismo VEGF fusionadas juntas, por ejemplo, la subunidad VEGF₁₆₅ fusionada a VEGF_{165b}.

En una realización, el análogo de VEGF es una molécula de cadena sencilla. Por ejemplo, el análogo de VEGF de la invención incluye dos subunidades de VEGF, es decir, monómeros, unidos juntos mediante un péptido enlazador. Una o ambas subunidades unidas pueden contener una o más sustituciones de aminoácido básico. Además, las subunidades unidas pueden ser subunidades diferentes de la proteína VEGF y pueden ser diferentes isoformas de la misma subunidad. Por ejemplo, la presente invención incluye una subunidad VEGF₁₆₅ de tipo silvestre unida mediante un enlazador GS a una subunidad VEGF₁₆₅ con una sustitución de aminoácido I83K.

En otra realización de la invención, una subunidad o dímero de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, o PIGF que comprende una o más mutaciones se fusiona a una toxina. El péptido de esta realización puede ser útil para direccionamiento y destrucción de células tumorales.

Los análogos de VEGF de la invención incluyen una o más sustituciones de aminoácido básico, tal como lisina o arginina, del grupo de posiciones 44, 67, 72, 73, 83, y 87. En particular, el análogo de VEGF contiene una sustitución de aminoácido básico en la posición 83 (I83K o I83R) y opcionalmente una o más sustituciones de aminoácido básico en las posiciones 44, 67, 72 y 73. Por ejemplo, la invención incluye un análogo de VEGF con una mutación I83K. La invención también incluye, por ejemplo, un análogo de VEGF con aminoácidos básicos adicionales en las posiciones 72 y 73.

Los análogos de VEGF con las sustituciones de aminoácido básico descritos en la presente memoria pueden

contener sustituciones adicionales de aminoácidos para aumentar adicionalmente la afinidad de unión al receptor a KDR y/o disminuir la afinidad de unión al receptor a neuropilina-1. Por ejemplo, la invención incluye mutaciones en las posiciones 146 y 160 en un acto por alterar el sitio de unión a neuropilina-1.

- 5 Los análogos de la invención también pueden contener sustituciones adicionales de aminoácidos que confieren estabilidad potenciada y semivida aumentada en suero. Por ejemplo, la invención incluye sustituciones de aminoácidos que eliminan sitios de escisión proteolítica tales como sustituciones en las posiciones 111 y 148.

- 10 Los antagonistas del receptor de VEGF de la presente invención pueden mostrar semivida aumentada en plasma en comparación con VEGF de tipo silvestre. Esto puede conseguirse modificando adicionalmente un análogo de VEGF por métodos conocidos en la técnica para aumentar la semivida o, alternativamente, la semivida aumentada en plasma puede ser una característica inherente de un análogo de VEGF. Los antagonistas del receptor de VEGF de la invención también pueden mostrar un aumento en la tasa de absorción y/o duración disminuida de acción en comparación con VEGF de tipo silvestre.

- 15 Los análogos modificados de la invención actúan como antagonistas del receptor de VEGF y por tanto proporcionan una solución largamente esperada para pacientes que padecen un amplio espectro de enfermedades y afecciones asociadas con angiogénesis. Los antagonistas del receptor de VEGF pueden administrarse a un paciente en solitario o junto con otro antagonista del receptor de VEGF, un fármaco antineoplásico, o un fármaco anti-angiogénesis para el tratamiento de enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo pero sin limitarse a, cánceres de tumor sólido, hemangiomas, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis séptica, asma, aterosclerosis, fibrosis pulmonar idiopática, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas, meningiomas, glaucoma neovascular, psoriasis, Síndrome de Kaposi, angiofibroma, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico, fibroplasia retrolental, esclerodermia, tracoma, enfermedad de von Hippel-Lindau, patologías de adhesión vascular, sinovitis, dermatitis, enfermedades degenerativas neurológicas, preeclampsia, infertilidad femenina inexplicable, endometriosis, infertilidad masculina inexplicable, pterigión, laceraciones, llagas, úlceras cutáneas, úlceras gástricas, y úlceras duodenales.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1A es un gráfico que compara la unión del mutante I83K y VEGF-A de tipo silvestre a KDR. La Figura 1B es un gráfico que muestra una disminución en la proliferación de células endoteliales HUVEC-2 en presencia del mutante I83K de VEGF-A en comparación con VEGF-A de tipo silvestre.

- 30 La Figura 2A es un gráfico que compara la unión del análogo E44R y VEGF-A de tipo silvestre a KDR. La Figura 2B es un gráfico que compara la proliferación de células HUVEC-2 en presencia del análogo E44R de VEGF-A frente a VEGF-A de tipo silvestre.

La Figura 3A es un gráfico que compara la unión del mutante E72R+E73R de VEGF y VEGF-A de tipo silvestre a KDR. La Figura 3B es un gráfico que compara la proliferación de células HUVEC-2 en presencia del mutante E72R+E73R de VEGF frente a VEGF-A de tipo silvestre.

- 35 La Figura 4 es un gráfico que compara la unión de los mutantes E44R y EE72/73RR con VEGF-A de tipo silvestre.

La Figura 5 es un gráfico que compara la unión del mutante Q87K con VEGF-A de tipo silvestre.

La Figura 6 es un gráfico que compara la unión del mutante E67K con VEGF-A de tipo silvestre.

Descripción detallada de la invención

- 40 La presente invención proporciona factores de crecimiento angiogénico modificados de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que muestran sorprendente actividad como antagonistas del receptor de VEGF. Como antagonistas del receptor de VEGF, los compuestos de la invención tienen propiedades "anti-angiogénicas". Estar "modificado" significa que, aunque la proteína contiene una secuencia de aminoácidos que difiere de un VEGF de tipo silvestre de interés, es decir, VEGF humano o VEGF animal, la secuencia no se ha cambiado de modo que es idéntica a la secuencia conocida de VEGF de otras especies. Los términos "mutado" y "sustituido" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para hacer referencia a restos modificados de aminoácido. Las expresiones "moléculas VEGF modificadas", "proteínas VEGF modificadas", "análogos de VEGF", "antagonistas del receptor de VEGF", "quimeras de VEGF", "proteínas de fusión de VEGF" y "moléculas de cadena sencilla de VEGF" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para hacer referencia a moléculas análogas modificadas de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y PIGF.

- 50 "Antagonistas" se usa de forma intercambiable en la presente memoria para hacer referencia a moléculas que actúan bloqueando, inhibiendo o reduciendo las actividades biológicas naturales de VEGF, tales como la inducción de angiogénesis. El término "anti-angiogénico" como se usa en la presente memoria significa que las moléculas VEGF modificadas de la invención bloquean, inhiben o reducen el proceso de angiogénesis, o el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos o linfáticos a partir de vasos preexistentes. Las actividades de los análogos de VEGF de la invención alteran la señalización normal VEGF/receptor que habitualmente sucede cuando se une

VEGF a un receptor. Por consiguiente, los análogos de la invención son antagonistas del receptor de VEGF. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que los análogos de VEGF de la invención alteran la dimerización de KDR necesaria para la señalización.

La inhibición de la angiogénesis puede ser completa o parcial. El antagonista del receptor de VEGF puede inhibir la angiogénesis al menos aproximadamente un 5%, al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 20%, al menos aproximadamente un 25%, al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, y al menos aproximadamente un 100% *in vitro* e *in vivo*. La inhibición de la angiogénesis puede medirse por un experto en la técnica mediante métodos conocidos en la técnica. La determinación de la inhibición de la angiogénesis puede incluir el uso de controles negativos y/o positivos. Por ejemplo, un experto en la técnica puede concluir que un análogo de VEGF de la invención inhibe la angiogénesis inducida por VEGF comparando la angiogénesis en un sujeto tratado con un análogo de VEGF de la invención con un sujeto similar no tratado con un análogo de VEGF.

Las moléculas VEGF modificadas de la invención presentan afinidad aumentada de unión al receptor o afinidad similar de unión al receptor a uno o más receptores nativos de VEGF en comparación con la de VEGF de tipo silvestre. Como se usa en la presente memoria, un receptor nativo de VEGF es un receptor no modificado que interacciona específicamente con VEGF. Por ejemplo, un receptor endógeno de VEGF es un receptor nativo de VEGF. En una realización de la invención, el receptor nativo es KDR. KDR es un receptor de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y VEGF-F. En otra realización, el receptor nativo es Flt-1. Flt-1 es un receptor de VEGF-A, VEGF-B y PlGF.

"Afinidad de unión al receptor" se refiere a la capacidad de un ligando de unirse a un receptor *in vivo* o *in vitro* y puede evaluarse por métodos fácilmente disponibles en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, ensayos de unión competitiva y ensayos de unión directa. Como se usa en la presente memoria, la afinidad de unión al receptor se refiere a la capacidad de moléculas VEGF de unirse a receptores nativos de VEGF, incluyendo, pero sin limitarse a, Flt-1 (también conocido como VEGF-R1), KDR (también conocido como VEGF-R2) y Flt-4 (también conocido como VEGF-R3). Por ejemplo, las moléculas VEGF-A modificadas de la invención presentan afinidad aumentada de unión al receptor o afinidad similar de unión a KDR en comparación con VEGF de tipo silvestre. En una realización, el aumento en la afinidad de unión al receptor de las moléculas VEGF modificadas de la invención es al menos aproximadamente 1,25 veces, al menos aproximadamente una 1,5 veces, al menos aproximadamente una 1,75 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces o al menos aproximadamente 10 veces mayor que la de VEGF de tipo silvestre.

En otra realización, el VEGF modificado muestra una afinidad de unión a receptor a KDR y/u otro receptor que está implicado en la angiogénesis que es similar o comparable con la de VEGF de tipo silvestre. La afinidad similar o comparable de unión al receptor es al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 97% o más de la de VEGF de tipo silvestre. Por ejemplo, la invención incluye análogos de VEGF-A que muestran aproximadamente del 75% al 85%, aproximadamente del 85% al 95% y aproximadamente del 95% al 100% de la afinidad de unión al receptor mostrada por VEGF de tipo silvestre.

La presente invención también incluye análogos de VEGF que presentan afinidad aumentada o similar de unión al receptor a al menos un receptor nativo pero que presentan afinidad disminuida de unión al receptor a otro receptor nativo. Por ejemplo, los análogos de VEGF-A de la invención pueden mostrar afinidad aumentada o similar de unión al receptor a KDR en comparación con VEGF de tipo silvestre, pero pueden mostrar afinidad disminuida de unión al receptor a Flt-1, neuropilina-1 o neuropilina-2 en comparación con VEGF-A de tipo silvestre.

Los análogos de VEGF de la invención también presentan una disminución en la bioactividad en comparación con VEGF de tipo silvestre. "Bioactividad" se refiere a las actividades biológicas naturales de VEGF *in vivo* e *in vitro*, incluyendo, pero sin limitarse a, la capacidad de VEGF de inducir la proliferación celular en células endoteliales. Una disminución en la bioactividad provoca una disminución en la angiogénesis. En una realización de la invención, los análogos de VEGF de la invención presentan una disminución en la bioactividad en comparación con VEGF de tipo silvestre de la misma isoforma. Por ejemplo, un análogo VEGF₁₆₅ de la invención puede presentar una disminución en la bioactividad en comparación con VEGF₁₆₅ de tipo silvestre, y un análogo de VEGF_{165b} puede presentar una disminución en la bioactividad en comparación con VEGF_{165b} de tipo silvestre.

La bioactividad puede evaluarse por varios métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, ensayos de viabilidad celular *in vitro* que ensayan la viabilidad de células endoteliales tales como células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tras exposición a VEGF. Una disminución en la viabilidad de las células endoteliales de al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos

aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95% o más en comparación con lo resultante de la exposición a VEGF de tipo silvestre es indicativa de una disminución en la bioactividad.

La bioactividad puede evaluarse también *in vivo*. Por ejemplo, la bioactividad puede evaluarse *in vivo* en un sujeto con un tumor detectando la ausencia de aumento en la angiogénesis alrededor de un tumor. La detección de la ausencia de aumento en la angiogénesis puede conseguirse por varios métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo de migración en matrigel *in vivo*, un ensayo de angiogénesis en disco, un ensayo que comprende una cámara de pliegue cutáneo dorsal en ratones, un trasplante de córnea y un modelo de angiogénesis por implante de esponja. En una realización, la angiogénesis se evalúa comparando la angiogénesis de y alrededor del tumor con la de un tumor de tipo, tamaño y localización similar en un sujeto no tratado. Pueden usarse métodos de biopsia conocidos en la técnica para extraer tejido y analizarlo para formación de vasos.

La "disociación" de la afinidad de unión a receptor y bioactividad se refiere al concepto de que la afinidad de unión al receptor y la bioactividad no están correlacionados. En comparación, la afinidad de unión al receptor y la bioactividad están correlacionados para proteínas VEGF de tipo silvestre tales como VEGF-A de tipo silvestre. Un aumento en la capacidad de unión al receptor, por ejemplo, se esperaría que provocara un aumento en la bioactividad para VEGF-A de tipo silvestre. Por otro lado, las moléculas VEGF modificadas de la invención demuestran una afinidad similar de unión al receptor o un aumento en la afinidad de unión al receptor en comparación con VEGF de tipo silvestre pero una disminución en la bioactividad en comparación con VEGF de tipo silvestre.

Los VEGF de mamíferos se producen en múltiples isoformas debido al corte y ajuste alternativo de una familia de genes relacionados. La presente invención describe análogos de VEGF que corresponden a isoformas de VEGF implicadas en la angiogénesis. Los análogos de VEGF de la presente invención pueden crearse usando cualquier isoforma de VEGF salvo que se indique otra cosa.

VEGF-A puede existir en isoformas incluyendo, pero sin limitarse a, de 121, 145, 148, 165, 183, 189, y 206 aminoácidos, respectivamente. Las tres especies principales de ARNm son VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ y VEGF₁₈₉. Como se usa en la presente memoria, VEGF₁₂₁ (SEC ID N° 6), VEGF₁₄₅ (SEC ID N° 8), VEGF₁₄₈ (SEC ID N° 10), VEGF₁₆₅ (SEC ID N° 4), VEGF_{165b} (SEC ID N° 13), VEGF₁₈₃ (SEC ID N° 15), VEGF₁₈₉ (SEC ID N° 17) y VEGF₂₀₆ (SEC ID N° 19) son isoformas de VEGF-A capaces de modificarse para que posean propiedades anti-angiogénicas. Las posiciones de aminoácido descritas en la presente memoria se basan en una molécula VEGF que carece de una secuencia líder tal como la secuencia líder de la SEC ID N° 3. Las secuencias de aminoácidos de las isoformas de VEGF-A con secuencia líder son las secuencias de las SEC ID N° 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16 y 18.

Las diversas isoformas de VEGF-A comparten un dominio amino-terminal común que consiste en 110 aminoácidos. Las isoformas de VEGF-A tienen un dominio de unión a receptor codificado por los exones 2-5. La diferencia más notable entre las isoformas se encuentra en los dominios de unión a neuropilina y a heparina que están codificados por los exones 6a, 6b, 7a y 7b.

La isoforma más común de VEGF-A es VEGF₁₆₅. El ácido nucleico que codifica VEGF₁₆₅ es la secuencia de la SEC ID N° 1. Recientemente, se describió una variante endógena de corte y ajuste mencionada como VEGF_{165b} que contiene secuencias codificadas por el exón 9, en lugar del exón 8, en el extremo carboxi. La molécula de ácido nucleico que codifica esta proteína es la secuencia de la SEC ID N° 11. VEGF_{165b} (SEC ID N° 12 con secuencia líder; SEC ID N° 13 sin secuencia líder) inhibía la señalización de VEGF en células endoteliales cuando se añadía con VEGF₁₆₅ (véase Woolard *et al*, 2004, Cancer Research. 64: 7822-7835; véase también el documento U.S. 2005/0054036).

En una realización de la invención, los análogos de VEGF son análogos de VEGF-A. Los análogos de VEGF-A incluyen "proteínas VEGF-A modificadas", "antagonistas del receptor de VEGF-A", "quimeras de VEGF-A", "proteínas de fusión de VEGF-A" y "moléculas de cadena sencilla de VEGF-A". Un análogo de VEGF-A es una molécula VEGF-A que contiene al menos una subunidad modificada de VEGF-A.

VEGF-B existe en dos isoformas, VEGF-B₁₆₇ (SEC ID N° 48) y VEGF-B₁₈₆ (SEC ID N° 50) (Makinen *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 274: 21217-21222). En una realización de la invención, el análogo de VEGF es un análogo de VEGF-B. Los análogos de VEGF-B incluyen "proteínas VEGF-B modificadas", "análogos de VEGF-B", "antagonistas del receptor de VEGF-B", "quimeras de VEGF-B", "proteínas de fusión de VEGF-B" y "moléculas de cadena sencilla de VEGF-B". Un análogo de VEGF-B es una molécula VEGF-B que contiene al menos una subunidad modificada de VEGF-B.

VEGF-C se produce como un propéptido (SEC ID N° 51) que se escinde proteolíticamente para formar una proteína activa de 21-kd (Nicosia, 1998, Am. J. Path. 153: 11-16). En una realización de la invención, el análogo de VEGF es un análogo de VEGF-C. Los análogos de VEGF-C incluyen "proteínas VEGF-C modificadas", "análogos de VEGF-C", "antagonistas del receptor de VEGF-C", "quimeras de VEGF-C", "proteínas de fusión de VEGF-C" y "moléculas de cadena sencilla de VEGF-C". Un análogo de VEGF-C es una molécula VEGF-C que contiene al menos una subunidad modificada de VEGF-C.

VEGF-D se produce también como un propéptido (SEC ID N° 52) que se escinde proteolíticamente para formar una

proteína activa. VEGF-D es un 48% idéntico a VEGF-C (Nicosia, *supra*). En una realización de la invención, el análogo de VEGF es un análogo de VEGF-D. Los análogos de VEGF-D incluyen "proteínas VEGF-D modificadas", "análogos de VEGF-D", "antagonistas del receptor de VEGF-D", "quimeras de VEGF-D", "proteínas de fusión de VEGF-D" y "moléculas de cadena sencilla de VEGF-D". Un análogo de VEGF-D es una molécula VEGF-D que

El factor de crecimiento placentario (PIGF) existe en tres isoformas, PIGF-1 (SEC ID N° 54), PIGF-2 (SEC ID N° 56) y PIGF-3 (SEC ID N° 58). PIGF-2 contiene un péptido codificado por el exón 6 que otorga las propiedades de unión a heparina y neuropilina-1 ausentes en las otras dos isoformas. Se ha informado de que tanto PIGF-1 como PIGF-2 son capaces de inducir la migración de células endoteliales (Migdal *et al.*, 1998, J. Biol. Chem. 273: 22272-22278). En una realización de la invención, el análogo de VEGF es un análogo de PIGF. En otra realización, el análogo de VEGF es PIGF-1 o PIGF-2. Los análogos de PIGF incluyen "proteínas PIGF modificadas", "análogos de PIGF", "antagonistas del receptor de PIGF", "quimeras de PIGF", "proteínas de fusión de PIGF" y "moléculas de cadena sencilla de PIGF". Los análogos de PIGF son moléculas PIGF con al menos una subunidad modificada de PIGF.

Los análogos de VEGF de la invención son moléculas VEGF animales o humanas modificadas. En una realización de la invención, los análogos de VEGF son moléculas VEGF de mamífero. En otra realización de la invención, los análogos de VEGF son moléculas VEGF de aves. Los análogos de VEGF de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, moléculas VEGF modificadas de primate, caninas, felinas, bovinas, equinas, porcinas, ovinas, murinas, de rata y conejo. En una realización, el análogo de VEGF animal es un análogo de VEGF-A. Por ejemplo, el análogo de VEGF-A animal de la invención puede ser un análogo de VEGF₁₆₅ o VEGF_{165b} animal.

Las moléculas VEGF modificadas de especies diferentes al ser humano tienen sustituciones en posiciones correspondientes a aquellas en las moléculas VEGF humanas modificadas descritas en la presente memoria y pueden identificarse usando cualquier programa de alineación, incluyendo pero sin limitarse a, los programas DNASIS, ALIONment, SIM y GCG tales como Gap, BestFit, FrameAlign, y Compare. Como puede apreciar un experto en la técnica, el correspondiente aminoácido a reemplazar con un aminoácido básico puede no ser idéntico a uno en VEGF-A humano. Por ejemplo, un experto en la técnica apreciaría que un glutamato (E) puede corresponder a un aminoácido ácido diferente tal como aspartato (D) en un animal.

En otra realización, el aminoácido correspondiente se identifica como localizado en la misma posición general dentro de una estructura definida, por ejemplo, en una estructura de bucle externo. La estructura de una proteína puede predecirse usando software basado en los aminoácidos de la proteína. Por consiguiente, un experto en la técnica puede usar software que predice el plegamiento de la proteína en la estructura de bucle para identificar la correspondiente posición en una proteína relacionada.

Diseño de antagonistas del receptor de VEGF

Los antagonistas del receptor de VEGF abarcados por la presente invención pueden diseñarse comparando las secuencias de aminoácidos del VEGF de interés con el de otras especies para identificar los restos básicos en las proteínas de VEGF de otras especies. Por ejemplo, puede diseñarse una molécula VEGF-A por ejemplo comparando un VEGF-A humano con el de otra especie. Dichos métodos se describen en el documento U.S. 6.361.992. También debe darse consideración a la actividad biológica relativa de VEGF de diversas especies en cuanto a qué especies elegir para comparación y sustitución de aminoácidos. Es útil el modelado adicional por homología basado en la estructura de glucoproteínas relacionadas para identificar los restos de aminoácidos expuestos en superficie. El modelado por homología puede realizarse por métodos conocidos generalmente en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, el uso de software informático de modelado de proteínas.

La presente invención también proporciona una proteína VEGF modificada, en donde el VEGF modificado comprende uno o más aminoácidos sustituidos en una o más posiciones correspondientes a la misma posición de aminoácido en una proteína VEGF de otra especie que tiene una afinidad de unión aumentada y/o bioactividad disminuida sobre el VEGF de tipo silvestre. Por ejemplo, el VEGF-F de veneno de serpiente se une a KDR con alta afinidad y estimula fuertemente la proliferación de células del endotelio vascular *in vitro*. Se puede comparar VEGF-A humano con el VEGF de veneno de serpiente, diseñar proteínas VEGF-A humanas con sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones donde difieren las secuencias del veneno de serpiente y humana, construir proteínas VEGF-A humanas con los cambios seleccionados, y administrar el VEGF-A humano modificado a seres humanos. Aunque el VEGF-F de veneno de serpiente muestra un aumento en la afinidad de unión a KDR y bioactividad, es decir, la afinidad de unión y la bioactividad están correlacionadas, en comparación con VEGF humano, un experto en la técnica entendería que podrían ensayarse empíricamente sustituciones de aminoácidos para identificar sustituciones de aminoácidos que aumenten la afinidad de unión al receptor pero disminuyan o no tengan efecto sobre la bioactividad. La sustitución de aminoácidos que aumenta la afinidad de unión al receptor y/o disminuye o no tiene efecto sobre la bioactividad después puede combinarse con una o más sustituciones de aminoácidos diferentes que se sabe que aumentan la afinidad de unión al receptor y/o disminuyen la bioactividad.

En otra realización de la invención, la molécula VEGF modificada puede contener uno o más aminoácidos sustituidos en una o más posiciones correspondientes a la misma posición de aminoácido en un homólogo de VEGF que existe de forma natural en artrópodos. En artrópodos, un único factor de crecimiento realiza las tareas

realizadas por PDGF y VEGF en organismos superiores. Un experto en la técnica entendería que podrían ensayarse empíricamente sustituciones de aminoácidos para identificar sustituciones de aminoácidos que aumenten la afinidad de unión al receptor pero disminuyan o no tengan efecto sobre la bioactividad o, alternativamente, tengan poco efecto sobre la afinidad de unión al receptor pero disminuyan la bioactividad.

Además, la presente invención proporciona un VEGF modificado, en donde el VEGF modificado comprende uno o más aminoácidos básicos sustituidos en una o más posiciones correspondientes al mismo aminoácidos en un VEGF o isoforma de VEGF diferente o glucoproteína muy relacionada tal como proteínas en la familia de PDGF de la misma especie o diferente especie. Por ejemplo, puede comprarse VEGF₁₆₅ con PDGF de la misma especie y hacerse sustituciones de aminoácidos en la proteína VEGF en base cualquier divergencia de secuencia. Un experto en la técnica puede comparar dos o más secuencias de proteínas VEGF o proteínas relacionadas con VEGF usando métodos conocidos en la técnica tales como el uso de software de alineación, incluyendo pero sin limitarse a, los programas DNASIS, ALIONment, SIM y GCG tales como Gap, BestFit, FrameAlign, y Compare.

En otro aspecto de la invención, las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente memoria pueden incorporarse en proteínas muy relacionadas tales como VEGF-E (SEC ID N° 60), VEGF-F (SEC ID N° 62) y PDGF (SEC ID N° 63 y SEC ID N° 64). Por ejemplo, pueden compararse una o más sustituciones de aminoácido básico seleccionadas del grupo que consiste en E67, E72, E73, I83 y Q87 con una isoforma de PDGF de la misma especie y hacerse sustituciones de aminoácidos a la isoforma de PDGF.

Los análogos de VEGF de la invención pueden diseñarse para que presenten una afinidad disminuida de unión al receptor a receptores Flt-1 en comparación con VEGF-A de tipo silvestre. Aunque estos análogos presentan una afinidad disminuida de unión al receptor a Flt-1, pueden tener una afinidad aumentada o comparable de unión al receptor a KDR en comparación con VEGF-A de tipo silvestre.

Los análogos de VEGF de la invención pueden diseñarse para que presenten una afinidad disminuida de unión al receptor a co-receptores incluyendo, pero sin limitarse a, neuropilina-1 o neuropilina-2 en comparación con la de VEGF de tipo silvestre. Los análogos con afinidad disminuida de unión al receptor a neuropilina-1 o neuropilina-2 pueden tener afinidad aumentada o similar de unión al receptor a KDR, Flt-1 o VEGFR3 en comparación con la de VEGF de tipo silvestre. Por ejemplo, los análogos de VEGF-A pueden diseñarse para que muestren afinidad disminuida de unión al receptor a neuropilina-1 y afinidad disminuida de unión al receptor a KDR y/o Flt-1. En una realización de la invención, el VEGF-A que presenta afinidad disminuida de unión al receptor a neuropilina-1 es un análogo diseñado en la variante de corte y ajuste VEGF_{165b}. En otra realización, pueden diseñarse análogos de VEGF-B₁₆₇ y PlGF-2 que muestren afinidad disminuida de unión al receptor a neuropilina-1 y afinidad aumentada de unión a Flt-1.

En una realización de la invención, se diseñan análogos de VEGF para que muestren afinidad disminuida de unión al receptor a neuropilina-1 o neuropilina-2 en comparación con VEGF de tipo silvestre alterando el sitio de unión a neuropilina de VEGF. Esto puede conseguirse reduciendo la cantidad de restos de aminoácido cisteína en el dominio de unión al receptor neuropilina-1. Por ejemplo, pueden diseñarse análogos de VEGF₁₆₅ para alterar el sitio de unión a neuropilina-1 en VEGF₁₆₅ sustituyendo los restos de cisteína en las posiciones 146 y/o 160 de la SEC ID N° 4 con aminoácidos tales como serina que causan una alteración en el enlace disulfuro. La sustitución de los restos de cisteína en las posiciones 146 y 160 de la SEC ID N° 4 altera la unión a neuropilina-1 pero no altera la unión a heparina. Mutaciones en las posiciones 146 y/o 160 pueden acoplarse con una o más mutaciones para aumentar, mantener o restaurar la afinidad de unión al receptor a KDR, Flt-1 y/o VEGFR3 como se describe en la presente memoria.

De manera similar, la presente invención incluye análogos de VEGF que muestran una afinidad de unión al receptor a neuropilina-2 disminuida en comparación con VEGF de tipo silvestre. Por ejemplo, la invención incluye análogos de VEGF-C y VEGF-D que muestran afinidad de unión reducida a neuropilina-2 pero afinidad aumentada o similar de unión a KDR y/o VEGFR3 en comparación con VEGF-C o VEGF-D de tipo silvestre, respectivamente.

La invención también incluye análogos de VEGF que muestran estabilidad potenciada y resistencia a proteasas. En una realización, las sustituciones de aminoácidos en las posiciones A111 y A148 de la SEC ID N° 4 se incorporan en un análogo de VEGF-A para mejorar la resistencia a proteasas. La invención también incluye análogos de VEGF-C y VEGF-D que contienen mutaciones que evitan la escisión del polipéptido VEGF-C o el polipéptido VEGF-D, respectivamente. Por ejemplo, la presente invención incluye análogos de VEGF-C y VEGF-D que contiene una o más mutaciones que inducen resistencia a la serina proteasa plasmina y/u otros miembros de la familia de plasminógeno.

En otra realización de la invención, los análogos de VEGF que muestran afinidad aumentada de unión al receptor a uno o más receptores de VEGF, preferiblemente KDR, pueden crearse en una molécula VEGF de origen natural que muestre propiedades antagonistas. Por ejemplo, puede modificarse VEGF_{165b}, una isoforma aislada de tejido renal, para que incorpore las sustituciones de aminoácidos asociadas con un aumento en la capacidad de unión al receptor y disminución en la bioactividad de la proteína. Asimismo, un experto en la técnica podría incorporar las sustituciones de aminoácidos de la presente invención en isoformas sintéticas o nuevas de VEGF que contengan las propiedades de VEGF_{165b}. En particular, las mutaciones de la invención pueden usarse con otras proteínas VEGF

que contengan los aminoácidos SLTRKD (SEC ID N°: 70), es decir, los aminoácidos codificados por lo que se ha llamado exón 9, además de o en lugar de los aminoácidos codificados por el exón 8 (CDKPRR; SEC ID N° 71).

Sustituciones de aminoácido

5 Los análogos de VEGF de la presente invención contienen una o más sustituciones de aminoácido básico que confieren afinidad potenciada de unión al receptor y bioactividad disminuida. En una realización de la invención, los análogos de VEGF son antagonistas del receptor de VEGF, incluyendo pero sin limitarse a antagonistas de VEGF-A.

10 Una molécula VEGF modificada de la invención puede tener una sustitución de aminoácido básico I83K o I83R en una o más subunidades, es decir, monómeros, de VEGF. En general, los aminoácidos básicos comprenden los aminoácidos lisina (K), arginina (R) e histidina (H), y cualquier otro aminoácido básico que pueda ser una modificación de cualquiera de estos tres aminoácidos, aminoácidos básicos sintéticos no encontrados normalmente en la naturaleza, o cualquier otro aminoácido que esté cargado positivamente a un pH neutro. Los aminoácidos preferidos, entre otros, se seleccionan del el grupo que consiste en lisina y arginina.

15 Una molécula VEGF modificada de la invención comprende al menos una subunidad modificada, en donde la subunidad modificada comprende una sustitución a K o R en la posición I83 de VEGF₁₆₅ humano de tipo silvestre (SEC ID N° 4), VEGF₁₂₁ (SEC ID N° 6), VEGF₁₄₅ (SEC ID N° 8), VEGF₁₄₈ (SEC ID N° 10), VEGF_{165b} (SEC ID N° 13), VEGF₁₈₃ (SEC ID N° 15), VEGF₁₈₉ (SEC ID N° 17) o VEGF₂₀₆ (SEC ID N° 19). Por ejemplo, la invención incluye una sustitución de aminoácido I83K en las SEC ID N° 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17 ó 19 correspondientes a las secuencias de aminoácidos de isoformas de VEGF-A.

20 La invención también incluye una sustitución a K o R en la posición correspondiente a la posición 83 en otras moléculas VEGF, es decir, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PIGF, tal como la posición I83 de VEGF-B₁₆₇ (SEC ID N° 48) o VEGF-B₁₈₆ (SEC ID N° 50) y la posición I91 de PIGF-1 (SEC ID N° 54), PIGF-2 (SEC ID N° 56) o PIGF-3 (SEC ID N° 58).

25 La invención incluye moléculas VEGF modificadas en animales diferentes de seres humanos, en donde la molécula VEGF contiene, en una o más subunidades, una sustitución a K o R en la posición correspondiente a la posición 83 en VEGF-A humano. En una realización, el VEGF animal modificado es una molécula VEGF-A modificada. Por ejemplo, la presente invención incluye una sustitución a K o R en la posición I83 en primate (SEC ID N° 22), la posición I82 en bovino (SEC ID N° 25), la posición I82 en canino (SEC ID N° 28), la posición I83 en pollo (SEC ID N° 31), la posición I82 en equino (SEC ID N° 182), la posición I82 en murino (SEC ID N° 37), la posición I82 en porcino (SEC ID N° 40), la posición I82 de rata (SEC ID N° 43) y la posición I82 en ovino (SEC ID N° 46).

30 La invención también prevé una proteína relacionada con VEGF modificada, incluyendo, pero sin limitarse a VEGF-E, VEGF-F y PDGF, que contienen una sustitución de aminoácido a K o R correspondiente a la posición I83 de la SEC ID N° 4. Por ejemplo, VEGF-F (SEC ID N° 62) puede modificarse para que incluya una sustitución de aminoácido I83K o I83R.

35 La molécula VEGF modificada de la invención puede contener sustituciones de aminoácidos básicos adicionales que aumentan adicionalmente la afinidad de unión o disminuyen la bioactividad de VEGF en comparación con VEGF de tipo silvestre tal como VEGF-A de tipo silvestre. Las moléculas VEGF con sustituciones de aminoácidos básicos adicionales en una o más de las posiciones 44, 67, 72, 73 y/o 87 de VEGF₁₆₅ (SEC ID N° 4), VEGF₁₂₁ (SEC ID N° 6), VEGF₁₄₅ (SEC ID N° 8), VEGF₁₄₈ (SEC ID N° 10), VEGF_{165b} (SEC ID N° 13), VEGF₁₈₃ (SEC ID N° 15), VEGF₁₈₉ (SEC ID N° 17) y VEGF₂₀₆ (SEC ID N° 19) pueden aumentar la afinidad de unión por KDR en comparación con VEGF de tipo silvestre. Por ejemplo, la invención incluye las modificaciones de aminoácidos básicos adicionales E44R, E44K, E72R, E72K, E73R, E73K, Q87R, Q87K y E67K.

45 En una realización de la invención, las sustituciones de aminoácidos básicos adicionales correspondientes a las posiciones 44, 67, 72, 73 y/o 87 de la SEC ID N° 4 se acoplan con la sustitución de aminoácido básico correspondiente a la posición 83 de la SEC ID N° 4 para producir antagonistas del receptor de VEGF. Por ejemplo, los aminoácidos modificados de la presente invención incluyen sustituciones de aminoácidos básicos en las posiciones 72+73+83, 44+83, 72+83, 73+83, 44+72+83, 44+73+83, 44+72+73+83, 44+83+87, 83+87, 67+72+73+83; 44+67+83, 67+72+83, 67+73+83, 44+67+72+83, 44+67+73+83, 44+67+72+73+83, 44+67+83+87 y 67+83+87.

50 En otra realización de la invención, el análogo es una molécula VEGF_{165b} que contiene uno o más aminoácidos básicos en las posiciones E44, E67, E72, E73 y Q87 y una sustitución a K o R en la posición I83. Cuando la isoforma de VEGF-A es VEGF_{165b}, es posible generar un análogo de VEGF de la invención con afinidad de unión aumentada y bioactividad disminuida en comparación con VEGF-A de tipo silvestre, incluyendo VEGF₁₆₅, incorporando una modificación de un único aminoácido que de lo contrario solamente provocaría un aumento en la afinidad de unión a receptor en otro VEGF₁₆₅.

55 Como puede apreciar un experto en la técnica, hay proteínas VEGF y proteínas relacionadas con VEGF diferentes a VEGF-A que contienen modificaciones de aminoácidos básicos correspondientes a los de las posiciones E44, E67, E72, E73 y/o Q87 de VEGF-A (SEC ID N° 4). Por ejemplo, hay un análogo de VEGF-B modificado (SEC ID N° 48 y 50) que contiene una o más sustituciones de aminoácidos básicos en las posiciones A44, E67, G72, Q73 y S87 y un

análogo de VEGF-F modificado (SEC ID N° 62) que contiene una o más sustituciones de aminoácidos básicos en las posiciones E44, E67, E72, E73 y Q87.

Una molécula VEGF-A modificada animal, es decir, no humana, de la invención asimismo puede contener modificaciones adicionales de aminoácidos para aumentar la afinidad de unión o disminuir la bioactividad de la molécula VEGF animal modificada en comparación con VEGF animal de tipo silvestre. La invención incluye el uso de estas modificaciones junto con una sustitución de aminoácido que corresponde a I83 de la SEC ID N° 4 como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, la presente invención incluye una o más sustituciones de aminoácidos básicos seleccionadas del grupo de posiciones E44, E67, E72, E73, I83 e I87 de VEGF-A de primate (macaco de cola larga) (SEC ID N° 22); una o más sustituciones de aminoácidos básicos seleccionadas del grupo de posiciones E43, E66, E71, E72, I82 y Q86 de VEGF-A bovino (SEC ID N° 25); una o más sustituciones de aminoácidos básicos seleccionadas del grupo de posiciones E43, E66, E71, E72, I82 y Q86 de VEGF-A canino (SEC ID N° 28); una o más sustituciones de aminoácidos básicos seleccionadas del grupo de posiciones E44, E67, D72, V73, I83 y Q87 de VEGF-A de ave (pollo) (SEC ID N° 31); una o más sustituciones de aminoácidos básicos seleccionadas del grupo de posiciones E43, E66, A71, E72, I82 y Q86 de VEGF-A equino (SEC ID N° 34); una o más sustituciones de aminoácidos básicos seleccionadas del grupo de posiciones E43, E66, S71, E72, I82 y Q86 de VEGF-A murino (SEC ID N° 37); una o más sustituciones de aminoácidos básicos seleccionadas del grupo de posiciones E43, E66, E71, E72, I82 y Q86 de VEGF-A porcino (SEC ID N° 40); una o más sustituciones de aminoácidos básicos seleccionadas del grupo de posiciones E43, E66, S71, E72, I82 y Q86 de VEGF-A de rata (SEC ID N° 43); y una o más sustituciones de aminoácidos básicos seleccionadas del grupo de posiciones E43, E66, E71, E72, I82 y Q86 de VEGF-A ovino (SEC ID N° 46).

También pueden combinarse análogos de VEGF que contienen una o más sustituciones de aminoácidos básicos con sustituciones de aminoácidos diseñadas para alterar un sitio de unión a co-receptor. En una realización, los análogos de VEGF de la invención contienen un sitio de unión a neuropilina-1 alterado. El sitio de unión a neuropilina-1 comprende los aminoácidos 111 a 165 de VEGF₁₆₅ (SEC ID N° 04). Este dominio solapa el dominio de unión a heparina codificado por los exones 6 y 7. La invención incluye cualquier modificación de aminoácido en o cerca (es decir, en aproximadamente 5 aminoácidos) que altere el dominio del sitio de unión a neuropilina-1 pero que no altere la capacidad del dominio de unión a heparina de unirse a sulfato de heparina. Dichas modificaciones de aminoácidos pueden determinarse empíricamente por un experto en la técnica.

En una realización de la invención, el dominio de unión a neuropilina-1 se altera reduciendo la cantidad de restos de aminoácido cisteína en el dominio, es decir, reduciendo la cantidad de restos de aminoácido cisteína entre los aminoácidos 111 a 165 de VEGF-A. Por ejemplo, pueden diseñarse análogos de VEGF₁₆₅ para alterar el sitio de unión a neuropilina-1 sustituyendo los restos de cisteína en las posiciones 146 y/o 160 de la SEC ID N° 4 con aminoácidos tales como serina que causa una alteración del puente disulfuro. La sustitución de restos de cisteína en las posiciones 146 y 160 de la SEC ID N° 4 altera la unión a neuropilina-1 pero no altera la unión a heparina. El sitio de unión a neuropilina-1 también puede alterarse finalizando el péptido de aminoácidos en la posición 146 ó 160.

La invención también puede incluir modificaciones de aminoácidos que rodean aminoácidos en las posiciones 146 y 160 de la SEC ID N° 4 de modo que los restos de cisteína de las posiciones 146 y 160 sean incapaces de formar un puente disulfuro. Por ejemplo, la invención incluye, pero no se limita a, una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 136 a 165 que son capaces de alterar la formación de un puente disulfuro.

En la presente memoria se describe un análogo de VEGF modificado de la invención que contiene sustitución I83K o I83R y una o más de las sustituciones de aminoácidos básicos correspondientes a E44, E67, E72, E73, y Q87 de la SEC ID N° 4. Por ejemplo, la invención incluye análogos de VEGF con sustituciones de aminoácidos en las posiciones I83R/K+C146X, I83R/K+C160X, I83R/K+C146X+C160X, E44B+I83R/K+C146X, E44B+I83R/K+C160X, E44B+I83R/K+C146X+C160X, E67B+I83R/K+C146X, E67B+I83R/K+C160X, E67B+I83R/K+C146X+C160X, E44B+E67B+I83R/K+C160X, E44B+E67B+I83R/K+C146X+C160X, E72B+I83R/K+C146X, E72B+I83R/K+C160X, E72B+I83R/K+C146X+C160X, E73B+I83R/K+C146X, E73B+I83R/K+C160X, E73B+I83R/K+C146X+C160X, E72B+E73B+I83R/K+C146X, E72B+E73B+I83R/K+C160X, E72B+E73B+I83R/K+C146X+C160X, I83R/K+Q87B+C146X, I83R/K+Q87B+C160X, I83R/K+Q87B+C146X+C160X, E44B+E67B+E72B+I83R/K+C146X, E44B+E67B+E72B+I83R/K+C160X, E44B+E67B+E72+I83R/K+C146X+C160X, E44B+E67B+E73B+I83R/K+C146X, E44B+E67B+E73B+I83R/K+C160X, E44B+E67B+E73B+I83R/K+C146X+C160X, E44B+E67B+E72B+E73B+I83R/K+C146X, E44B+E67B+E72B+E73B+I83R/K+C160X, E44B+E67B+E72B+E73B+I83R/K+C146X+C160X, E67B+E72B+E73B+I83R/K+C160X, E67B+E72B+E73B+I83R/K+C146X+C160X, E44B+E72B+E73B+I83R/K+C146X, E44B+E72B+E73B+I83R/K+C160X y E44B+E72B+E73B+I83R/K+C146X+C160X, en donde B es un aminoácido básico y X es cualquier aminoácido diferente a cisteína. En una realización, X es serina.

Las proteínas modificadas de la invención también pueden contener sustituciones adicionales, particularmente sustituciones conservativas que no alteran las propiedades potenciadas de la proteína. Típicamente, sin embargo, dichas proteínas modificadas contendrán menos de cinco sustituciones en las posiciones diferentes a las enumeradas anteriormente, y pueden mostrar identidad completa de secuencia de aminoácidos con las correspondientes subunidades de VEGF de tipo silvestre en posiciones diferentes a las posiciones enumeradas anteriormente.

Como puede apreciar un experto en la técnica, todas las sustituciones de aminoácidos y modificaciones peptídicas descritas en la presente invención pueden incorporarse en cualquier proteína VEGF o proteína relacionada, independientemente de la especie, a causa del elevado grado de homología entre proteínas VEGF y proteínas relacionadas. Un experto en la técnica puede correlacionar las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente memoria usando métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, el uso de software de alineación de secuencia de aminoácidos.

Análogos de VEGF con semivida aumentada en suero

Los análogos de VEGF de la invención pueden tener una semivida aumentada en plasma en comparación con VEGF de tipo silvestre. En una realización, la modificación o modificaciones que aumentan o mantienen la afinidad de unión al receptor y disminuyen la bioactividad en comparación con VEGF de tipo silvestre también aumentan la semivida en plasma del VEGF en comparación con VEGF de tipo silvestre. En otra realización, las proteínas VEGF modificadas de la invención se modifican adicionalmente de modo que la semivida en plasma se aumente en comparación con VEGF de tipo silvestre.

Hay muchas modificaciones conocidas en la técnica que pueden usarse para aumentar la semivida de proteínas, en particular glucoproteínas. Por ejemplo, las proteínas VEGF modificadas de la invención pueden comprender adicionalmente al menos una secuencia con un sitio potencial de glucosilación incluyendo secuencias que comprenden sitios de N-glucosilación y/o O-glucosilación en la cadena alfa o beta. Las secuencias que proporcionan sitios potenciales de reconocimiento para glucosilación pueden ser una extensión N-terminal o C-terminal en cualquier subunidad. Proteínas modificadas ejemplares contienen una extensión N-terminal en una subunidad que se selecciona del grupo que consiste en ANITV (SEC ID N° 72) y ANITVNITV (SEC ID N° 73).

La semivida aumentada también puede proporcionarse mediante el uso de extensiones peptídicas tales como un péptido de extensión carboxilo terminal de hCG. Véase el documento US 09/519.728. Una subunidad de un análogo de VEGF puede unirse covalentemente por cualquier método conocido en la técnica a un CTEP, por ejemplo, mediante un enlace peptídico o mediante un reactivo heterobifuncional capaz de formar un enlace covalente entre el extremo amino terminal y carboxilo terminal de una proteína, incluyendo pero sin limitarse a un enlazador peptídico.

En otra realización de la invención, las sustituciones de aminoácidos básicos de la invención se acoplan con una o más sustituciones de aminoácidos que potencial la estabilidad y aumentan la semivida en suero eliminando uno o más sitios de escisión proteolítica. En una realización, las sustituciones adicionales de aminoácidos reducen la escisión proteolítica. En otra realización, las sustituciones adicionales de aminoácidos evitan la escisión proteolítica. La invención incluye análogos de VEGF que contienen una o más mutaciones que inducen resistencia a plasmina y otros miembros de la familia de plasminógeno. En una realización de la invención, al menos una subunidad de una molécula VEGF contiene una sustitución de aminoácido correspondiente a las posiciones de aminoácido A111 y/o A148 tales como A111P y/o A148P de VEGF₁₆₅ (SEC ID N° 4) o VEGF_{165b} (SEC ID N° 13). Por ejemplo, la invención incluye VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ que contienen una sustitución de aminoácido en la posición A111. La invención incluye una o más mutaciones en VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PIGF que inhiben o reducen la escisión por proteasa. Por ejemplo, la invención incluye sustituciones de aminoácidos que evitan la escisión de VEGF-C y VEGF-D necesaria para la bioactividad.

En otra realización, la semivida puede aumentar uniendo monómeros de VEGF y construyendo proteínas de fusión. El aumento del tamaño de un análogo de VEGF sin interferir con los sitios de unión puede aumentar la semivida de la molécula.

La semivida aumentada puede proporcionarse por reticulación, incluyendo pero sin limitarse a pegilación o conjugación de otros grupos químicos apropiados. Dichos métodos son conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos 5.612.034, la patente de Estados Unidos 6.225.449, y la patente de Estados Unidos 6.555.660. La semivida también puede aumentarse aumentando la cantidad de restos cargados negativamente dentro de la molécula, por ejemplo, la cantidad de restos de glutamato y/o aspartato. Dicha alteración puede conseguirse por mutagénesis dirigida al sitio o mediante una inserción de una secuencia de aminoácidos que contenga uno o más restos cargados negativamente en dicho VEGF modificado, incluyendo inserciones seleccionadas del grupo que consiste en GEFT y GEFTT, entre otras.

La semivida de una proteína es una medición de la estabilidad de la proteína e indica el tiempo necesario para una reducción de la mitad en la concentración de la proteína. La semivida en suero de las moléculas VEGF modificadas descritas en la presente memoria puede determinarse por cualquier método adecuado para medir los niveles de VEGF en muestras de un sujeto en el tiempo, por ejemplo, pero sin limitarse a, inmunoensayos usando anticuerpos anti-VEGF para medir los niveles de VEGF en muestras de suero tomadas durante un periodo de tiempo después de la administración del VEGF modificado, o por detección de moléculas VEGF marcadas, es decir, moléculas radiomarcadas, en muestras tomadas de un sujeto después de la administración del VEGF marcado.

La tasa de absorción de un análogo de VEGF de la presente invención puede provocar duración aumentada o disminuida de la acción. Un análogo de VEGF con una tasa aumentada de absorción y duración disminuida de la acción puede ser beneficioso para pacientes que reciben una composición farmacéutica de análogo de VEGF

mediante administración subcutánea u otra vía de administración generalmente asociada con una tasa lenta de absorción y/o duración aumentada de la acción contrarrestando las cualidades de absorción asociadas con la vía de administración.

Enlazador

5 El análogo de VEGF de la invención puede contener dos o más monómeros separados por un péptido enlazador. Puede usarse un péptido enlazador para formar un análogo de VEGF en una conformación de cadena sencilla. Un experto en la técnica puede apreciar que pueden usarse diversos tipos de enlazadores en la presente invención para formar una molécula de cadena sencilla de VEGF que sea capaz de unirse a un receptor de VEGF y que actúe como antagonista del receptor de VEGF. Un péptido enlazador no debe impedir la capacidad de la molécula de
10 cadena sencilla de unirse a un receptor de VEGF.

El péptido enlazador puede variar de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 o más aminoácidos de longitud. Por ejemplo, el enlazador puede consistir en aproximadamente 2 aminoácidos, aproximadamente 3 aminoácidos, aproximadamente 4 aminoácidos, aproximadamente 5 aminoácidos, aproximadamente 6 aminoácidos, aproximadamente 7 aminoácidos, aproximadamente 8 aminoácidos, aproximadamente 9 aminoácidos,
15 aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 10-15 aminoácidos, o aproximadamente 15-20 aminoácidos. En una realización de la invención, el enlazador es Gly-Ser o contiene Gly-Ser. En otra realización, el enlazador es una cadena polipeptídica rica en glicina.

Pueden construirse moléculas VEGF que contienen un enlazador usando los métodos descritos en la presente memoria. Un experto en la técnica sería capaz de apreciar que las moléculas análogas de VEGF de la invención que contienen péptidos enlazadores pueden incluir cualquiera de las mutaciones descritas en la presente memoria, en uno o más monómeros. Además, un análogo de VEGF que contienen uno o más péptidos enlazadores puede unirse a más de un tipo de proteína o isoforma de VEGF. Por ejemplo, la presente invención incluye, pero no se limita a, una molécula de cadena sencilla de VEGF modificada con un monómero de VEGF₁₆₅ de tipo silvestre unido a un monómero de VEGF₁₆₅ modificado que contiene una sustitución I83R p I83K; un monómero de VEGF₁₆₅ de tipo
20 silvestre unido a un VEGF_{165b} modificado que contiene una sustitución I83R o I83K; y un monómero de VEGF₁₆₅ modificado fusionado a un monómero de VEGF-F modificado.

Proteínas de fusión de VEGF

La presente invención también incluye proteínas de fusión, es decir, quimeras, que contienen una o más proteínas VEGF modificadas o fragmentos. "Proteína de fusión" y "quimera" se usan de forma intercambiable en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, un resto VEGF es una proteína VEGF o fragmento proteico que contiene una o más de las sustituciones de aminoácidos básicos de la invención. Una proteína de fusión de VEGF puede tener uno o más restos VEGF.
30

Dicha proteína de fusión puede prepararse ligando las secuencias apropiadas de ácido nucleico que codifican las secuencias deseadas de aminoácidos entre sí por métodos conocidos en la técnica, en la fase codificante apropiada, y expresando la proteína de fusión mediante cualquiera de los medios descritos en la presente memoria. Como alternativa, dicha proteína de fusión puede prepararse mediante técnicas de síntesis de proteínas, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos.
35

La proteína de fusión de la invención contiene al menos una proteína VEGF o fragmento proteico que contiene una o más sustituciones de aminoácidos básicos descritas en la presente memoria. En una realización la proteína de fusión contiene una sustitución de aminoácido básico a R o K en la posición I83 de VEGF₁₆₅ (SEC ID N° 4), VEGF_{165b} (SEC ID N° 13), VEGF₁₂₁ (SEC ID N° 6), VEGF₁₄₅ (SEC ID N° 8), VEGF₁₄₈ (SEC ID N° 10), VEGF₁₈₃ (SEC ID N° 15), VEGF₁₈₉ (SEC ID N° 17) o VEGF₂₀₆ (SEC ID N° 19). En otra realización, la proteína de fusión contiene al menos una sustitución de aminoácido básico en una posición correspondiente a I83K de la SEC ID N° 4 en otra proteína VEGF, por ejemplo, una isoforma de VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o PIGF. Como puede apreciar un experto en la técnica, pueden usarse proteínas VEGF humanas o animales o fragmentos de las mismas para las proteínas de fusión de la invención.
40 45

En una realización de la invención, se fusionan dos subunidades diferentes de proteína VEGF o fragmentos de las mismas. Por ejemplo, la invención incluye una subunidad de VEGF-A o fragmento de la misma fusionada a una subunidad de VEGF-B o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF-C o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF-D o fragmento de la misma, o una subunidad de PIGF o fragmento de la misma; una subunidad de VEGF-B o fragmento de la misma fusionada a una subunidad de VEGF-A o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF-C o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF-D o fragmento de la misma, o una subunidad de PIGF o fragmento de la misma; una subunidad de VEGF-C o fragmento de la misma fusionada a una subunidad de VEGF-A o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF-B o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF-D o fragmento de la misma, o una subunidad de PIGF o fragmento de la misma; una subunidad de VEGF-D o fragmento de la misma fusionada a una subunidad de VEGF-A o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF-B o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF-C o fragmento de la misma, o una subunidad de PIGF o fragmento de la misma; y una subunidad de PIGF o fragmento de la misma fusionada a una
50 55

subunidad de VEGF-A o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF-B o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF-C o fragmento de la misma, o una subunidad de VEGF-D o fragmento de la misma.

La invención incluye proteínas de fusión compuestas por dos o más isoformas diferentes de la misma proteína VEGF o fragmentos de la misma. Por ejemplo, la invención incluye una proteína de fusión compuesta por una subunidad de VEGF₁₆₅ o fragmento de la misma fusionada a una subunidad de VEGF₁₂₁ o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF₁₄₅ o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF₁₄₈ o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF_{165b} o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF₁₈₃ o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF₁₈₉ o fragmento de la misma, o una subunidad de VEGF₂₀₆ o fragmento de la misma. La invención también incluye una subunidad de VEGF_{165b} o fragmento de la misma fusionada a una subunidad de VEGF₁₂₁ o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF₁₄₅ o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF₁₄₈ o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF₁₆₅ o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF₁₈₃ o fragmento de la misma, una subunidad de VEGF₁₈₉ o fragmento de la misma, o una subunidad de VEGF₂₀₆ o fragmento de la misma.

Las sustituciones de aminoácidos básicos de la invención pueden estar presentes en una o más subunidades de la proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión que contiene una subunidad de VEGF₁₆₅ y subunidad de VEGF_{165b} puede contener solamente una sustitución de aminoácido en la subunidad de VEGF₁₆₅. La invención incluye una subunidad de VEGF₁₆₅ de tipo silvestre fusionada mediante un enlazador GS a un VEGF₁₆₅ que contiene una sustitución de aminoácido I83K. Como puede apreciar un experto en la técnica, las proteínas de fusión de la presente invención que contienen una subunidad mutada pueden crearse en ambas orientaciones, es decir, la subunidad que contiene la mutación puede estar en el extremo N- o C-terminal de la proteína de fusión.

En otra realización de la invención, una subunidad de VEGF o fragmento de la misma se fusiona a una subunidad de proteína relacionada o fragmento de la misma. Por ejemplo, una subunidad de VEGF o fragmento de la misma puede fusionarse a una subunidad de PDGF u otra subunidad glucoproteica o fragmento de la misma.

Como puede apreciar un experto en la técnica, las proteínas de fusión descritas en la presente memoria pueden construirse usando secuencias humanas o animales de VEGF. Además, puede construirse una proteína de fusión usando una subunidad humana de VEGF fusionada a una subunidad animal de VEGF.

Debe entenderse que una proteína de fusión de VEGF es un análogo de VEGF. Todas las modificaciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, modificaciones para aumentar adicionalmente la afinidad de unión al receptor, modificaciones para aumentar la semivida y estabilidad, modificaciones para reducir o inhibir la escisión por proteasa, y modificaciones para alterar un sitio de unión a co-receptor tal como un sitio de unión a neuropilina-1 pueden incorporarse en una o más subunidades de la proteína de fusión de VEGF.

Las proteínas de fusión de la invención también pueden contener un enlazador que separe las dos o más subunidades de VEGF o subunidades de proteína relacionada con VEGF. El enlazador puede unirse covalentemente a y entre los péptidos de la proteína de fusión.

Proteínas de fusión de VEGF y toxina

La presente invención proporciona proteínas de fusión que comprenden una toxina y una o más subunidades de VEGF modificadas, es decir, monómeros, que contienen una o más de las sustituciones de aminoácidos básicos descritas en la presente memoria. Por ejemplo, el monómero de VEGF, es decir, subunidad, de una proteína de fusión de VEGF-toxina puede contener una sustitución I83K o I83R y opcionalmente un aminoácido básico en una o más posiciones de aminoácido correspondientes a las posiciones de aminoácido del grupo que consiste en 44, 67, 72, 73 y 87 (SEC ID N° 4 o SEC ID N° 13). Las proteínas de fusión de VEGF y toxina de la invención pueden contener opcionalmente una secuencia enlazadora que separa la toxina y una o más subunidades de VEGF.

Como se usa en la presente memoria, el término "toxina" se refiere a una sustancia tóxica de origen biológico. La toxina de la invención puede ser una toxina soluble conocida en la técnica. Las proteínas de fusión que comprenden una toxina soluble pueden usarse para abordar tumores. Dichas proteínas de fusión también pueden usarse para propósitos de diagnóstico.

Ejemplos de toxinas incluyen, pero no se limitan a, exotoxinas de *Pseudomonas* (PE), toxinas de *Difteria* (DT), toxina ricina, toxina abrina, toxina ántrax, toxina shiga, toxina de botulismo, toxina tetánica, toxina de cólera, maitotoxina, palitoxina, ciguatoxina, textilotoxina, batracotoxina, alfa conotoxina, taipoxina, tetrodotoxina, alfa toxina tityus, saxitoxina, anatoxina, microcistina, aconitina, toxinas exfoliatina A y B, enterotoxinas, toxina del síndrome de choque tóxico (TSST-1), toxina de *Y. pestis*, toxina de gangrena gaseosa, y otras.

En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una toxina soluble fusionada a un VEGF modificado y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la presente invención proporciona el uso de una proteína de fusión de VEGF modificado que comprende una toxina soluble para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones asociadas con angiogénesis.

Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que la proteína de fusión de VEGF-toxina de la invención evita o reduce la angiogénesis, el crecimiento de tumores y/o la propagación de cáncer por abordaje y eliminación del receptor de VEGF y las células endoteliales y tumorales adyacentes.

Expresión y/o síntesis de antagonistas del receptor de VEGF

- 5 La presente invención incluye ácidos nucleicos que codifican las proteínas VEGF modificadas de la invención, así como vectores y células hospedadoras que expresan los ácidos nucleicos.

Como se usa en la presente memoria, los términos "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refieren a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. La invención incluye una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula VEGF modificada de la invención. Por ejemplo, la invención incluye una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula VEGF₁₆₅ modificada. La molécula de ácido nucleico de la SEC ID N° 1 que codifica VEGF₁₆₅ de tipo silvestre puede mutarse por métodos conocidos en la técnica de modo que la molécula de ácido nucleico de VEGF₁₆₅ mutado codifique la proteína modificada. Asimismo, la molécula de ácido nucleico de la SEC ID N° 11 que codifica VEGF_{165b} de tipo silvestre puede mutarse por métodos conocidos en la técnica de modo que codifique una molécula VEGF_{165b} de la invención.

- 15 Una vez construido, modificado o aislado un ácido nucleico que codifica un VEGF modificado particular de interés, o una región de ese ácido nucleico que codifica una parte de la proteína que contiene una sustitución de aminoácido básico, ese ácido nucleico puede después clonarse en un vector apropiado, que puede dirigir la síntesis in vivo o in vitro de la proteína VEGF modificada. Como alternativa, el ácido nucleico que codifica un análogo de VEGF de la invención puede clonarse o modificarse directamente en el vector de expresión de interés. Se contempla que el vector tenga los elementos funcionales necesarios que dirigen y regulan la transcripción del gen insertado, o gen híbrido. Estos elementos funcionales incluyen, pero no se limitan a, un promotor, regiones cadena arriba o cadena abajo del promotor, tales como potenciadores que pueden regular la actividad transcripcional del promotor, un origen de replicación, sitios apropiados de restricción para facilitar la clonación de insertos adyacentes al promotor, genes de resistencia a antibiótico u otros marcadores que pueden servir para seleccionar células que contienen el vector o el vector que contiene el inserto, uniones de corte y ajuste de ARN, una región de terminación de la transcripción, o cualquier otra región que pueda servir para facilitar la expresión del gen insertado o gen híbrido. (Véase en líneas generales, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989)). Los promotores apropiados para la expresión de ácidos nucleicos en diferentes células hospedadoras son bien conocidos en la técnica, y se intercambian fácilmente dependiendo del sistema vector-hospedador usado para la expresión. Vectores y células hospedadoras ejemplares se describen en el documento U.S. 6.361.992.

- Existen numerosos vectores de expresión de *E. coli* (*Escherichia coli*) conocidos para un experto en la técnica que son útiles para la expresión del inserto de ácido nucleico. Otros vectores adecuados para su uso incluyen vectores de expresión de bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriaceae, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. Estos vectores de expresión típicamente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (p. ej., un origen de replicación). Además, estará presente cualquier cantidad de una diversidad de promotores bien conocidos, tal como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (Trp), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor de fago lambda. Los promotores típicamente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitio de unión al ribosoma, por ejemplo, para iniciar y completa la transcripción y traducción. Si fuera necesario, puede proporcionarse una metionina amino terminal por inserción de un codón de Met 5' y en fase con el inserto de ácido nucleico cadena abajo. Además, la extensión carboxi-terminal del inserto de ácido nucleico puede retirarse usando procedimientos convencionales de mutagénesis con oligonucleótido.

- Además, pueden usarse sistemas de expresión de levaduras. Hay varias ventajas para los sistemas de expresión de levaduras. Primero, existen evidencias de que proteínas producidas en un sistemas de secreción de levaduras muestran correcto emparejamiento disulfuro. Segundo, la glucosilación post-traducciona se consigue eficazmente por sistemas de secreción de levaduras. La región líder de pre-pro-factor-alfa de *Saccharomyces cerevisiae* (codificada por el gen MF"-1) se usa de forma rutinaria para dirigir la secreción de proteínas desde levaduras. (Brake, et al., "varies-Factor-Directed Synthesis and Secretion of Mature Foreign Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc. Nat. Acad. Sci., 81:4642-4646 (1984)). La región líder de pre-pro-factor-alfa contiene un péptido señal y un pro-segmento que incluye una secuencia de reconocimiento para una proteasa de levadura codificada por el gen KEX2. Esta enzima escinde la proteína precursora en el lado carboxilo de una secuencia señal de escisión de dipéptido Lys-Arg. La secuencia codificante de VEGF puede fusionarse en fase a la región líder de pre-pro-factor-alfa. Esta construcción después se pone bajo el control de un fuerte promotor de la transcripción, tal como el promotor de la alcohol deshidrogenasa I o un promotor glucolítico. El ácido nucleico que codifica la secuencia está seguido de un codón de terminación de la traducción que está seguido de señales de terminación de la transcripción. Como alternativa, el ácido nucleico que codifica las secuencias puede fusionarse a una segunda secuencia que codifica proteína, tal como Sj26 o beta-galactosidasa, que puede usarse para facilitar la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad. La inserción de sitios de escisión por proteasa para separar los componentes de la proteína de fusión es aplicable a construcciones usadas para la expresión en levaduras. También puede conseguirse una eficaz glucosilación post-traducciona y expresión de proteínas recombinantes en sistemas de Baculovirus.

Las células de mamífero permiten la expresión de proteínas en un entorno que favorece importantes modificaciones post-traduccionales tales como plegamiento y apareamiento de cisteínas, adición de estructuras complejas de carbohidrato, y secreción de proteína activa. Los vectores útiles para la expresión de proteínas activas en células de mamífero se caracterizan por la inserción de la secuencia codificante de la proteína entre un fuerte promotor viral u otro promotor y una señal de poliadenilación. Los vectores pueden contener genes que confieren resistencia a higromicina, resistencia a gentamicina, u otros genes o fenotipos adecuados para su uso como marcadores de selección, o resistencia a metotrexato para amplificación génica. La secuencia que codifica la proteína química puede introducirse en una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) usando un vector codificante de resistencia a metotrexato, u otras líneas celulares usando marcadores adecuados de selección. La presencia del ADN vector en células transformadas puede confirmarse por análisis de transferencia de Southern. La producción de ARN correspondiente a la secuencia codificante del inserto puede confirmarse por análisis de transferencia de Northern. Se han desarrollado en la técnica otras varias líneas adecuadas de células hospedadora capaz de secretar proteínas humanas intactas, e incluyen las líneas celulares CHO, células HeLa, líneas celulares de mieloma, células Jurkat, etc. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador, y sitios necesarios de procesamiento de información, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y ajuste de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Secuencias ejemplares de control de la expresión son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, Adenovirus, virus de papiloma bovino, etc. Los vectores que contienen los segmentos de ácido nucleico de interés pueden transferirse a la célula hospedadora por métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, la transformación con cloruro de calcio se utiliza habitualmente para células procariotas, mientras que puede usarse transfección mediada por fosfato de calcio, DEAE dextrano, o lipofectina o electroporación para otros hospedadores celulares.

La expresión del gen o gen híbrido puede ser *in vivo* o *in vitro*. La síntesis *in vivo* comprende transformar células procariotas o eucariotas que pueden servir como células hospedadoras para el vector. Por ejemplo, las técnicas para transformar hongos son bien conocidas en la bibliografía, y se han descrito, por ejemplo, por Beggs (ibid.), Hinnen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933, 1978), Yelton et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1740-1747, 1984), y Russell (Nature 301: 167-169, 1983). Pueden usarse otras técnicas para introducir secuencias de ADN clonado en células fúngicas, tales como electroporación (Becker y Guarente, Methods in Enzymol. 194: 182-187, 1991). El genotipo de la célula hospedadora generalmente contendrá un defecto genético que se complementa por el marcado de selección presente en el vector de expresión. La elección de un hospedador particular y marcador de selección pertenece a las habilidades del experto en la técnica.

Las secuencias de ADN clonado que comprenden VEGF modificado y proteínas de fusión de VEGF de la invención pueden introducirse en células de mamífero cultivadas por, por ejemplo, transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler et al., Cell 14: 725, 1978; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52: 456, 1973). También pueden usarse otras técnicas para introducir secuencias de ADN clonado en células de mamífero, tales como electroporación (Neumann et al., EMBO J. 1: 841-845, 1982), o lipofección. Para identificar células que hayan integrado el ADN clonado, generalmente se introduce un marcador de selección en las células junto con el gen o ADNc de interés. Los marcadores de selección preferidos para su uso en células de mamífero cultivadas incluyen genes que confieren resistencia a fármacos, tales como neomicina, higromicina, y metotrexato. El marcador de selección puede ser un marcador de selección amplificable. Un marcador de selección amplificable preferido es el gen DHFR. Un marcador amplificable particularmente preferido es el ADNc de DHFR^r (véase la patente de Estados Unidos 6.291.212) (Simonsen y Levinson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495-2499, 1983). Los marcadores de selección se revisan por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass.) y la elección de los marcadores de selección pertenecerá a las habilidades del experto en la técnica.

Como alternativa, la expresión del gen puede suceder en un sistema de expresión *in vitro*. Por ejemplo, están disponibles en el mercado sistemas de transcripción *in vitro* que se usan de forma rutinaria para sintetizar cantidades relativamente grandes de ARNm. En dichos sistemas de transcripción *in vitro*, el ácido nucleico que codifica el VEGF modificado se clonaría en un vector de expresión adyacente a un promotor de transcripción. Por ejemplo, los vectores de clonación y expresión Bluescript II contienen múltiples sitios de clonación que están flanqueados por fuertes promotores procariotas de transcripción. (Stratagene Cloning Systems La Jolla, Calif.). Están disponibles kits que contienen todos los reactivos necesarios para la síntesis *in vitro* de un ARN a partir de un molde de ADN tal como los vectores Bluescript. (Stratagene Cloning Systems La Jolla, Calif.). El ARN producido *in vitro* por un sistema tal como este puede después traducirse *in vitro* para producir el análogo deseado de VEGF (Stratagene Cloning Systems La Jolla, Calif.).

Otro método para producir un antagonista del receptor de VEGF es unir dos péptidos o polipéptidos juntos mediante técnicas de química de proteínas. Los péptidos o polipéptidos pueden sintetizarse químicamente usando equipo de laboratorio actualmente disponible usando química Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) o Boc (terc-butiloxycarbonilo). (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif.). Un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que un péptido o polipéptido correspondiente a una proteína VEGF híbrida puede sinterizarse por reacciones químicas convencionales. Por ejemplo, un péptido o polipéptido puede sintetizarse y no escindirse de su resina de síntesis mientras el otro fragmento de un péptido híbrido puede sintetizarse y posteriormente escindirse de la resina, exponiendo de ese modo un grupo terminal que se bloquea funcionalmente en el otro fragmento. Mediante

reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos pueden unirse covalentemente mediante un enlace peptídico en sus extremos carboxilo y amino, respectivamente, para formar un péptido híbrido. (Grant, G. A., "Synthetic Peptides: A User Guide," W. H. Freeman y Co., N.Y. (1992) y Bodansky, M y Trost, B., Ed., "Principles of Peptide Synthesis," Springer-Verlag Inc., N.Y. (1993)). Como alternativa, el péptido o polipéptido puede sintetizarse independientemente *in vivo* como se ha descrito anteriormente. Una vez aislados, estos péptidos o polipéptidos independientes pueden unirse para formar un VEGF mediante reacciones similares de condensación de péptidos. Por ejemplo, el ligamiento enzimático o químico de segmentos peptídicos clonados o sintéticos puede permitir que fragmentos peptídicos relativamente cortos se unan para producir fragmentos peptídicos más grandes, polipéptidos o dominios proteicos completos (Abrahmsen, L., et al., *Biochemistry*, 30:4151 (1991); Dawson, et al., "Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation," *Science*, 266:776-779 (1994)).

La invención también proporciona fragmentos de VEGF modificado que tienen actividad antagonista. Los fragmentos polipeptídicos de la presente invención pueden ser proteínas recombinantes obtenidas por clonación de ácidos nucleicos que codifican los péptidos en un sistema de expresión capaz de producir los péptidos. Por ejemplo, pueden retirarse secuencialmente aminoácidos amino o carboxi-terminales de la forma nativa o la proteína VEGF y la actividad respectiva ensayarse en uno de muchos ensayos disponibles descritos anteriormente. En otro ejemplo, las proteínas modificadas de la invención pueden tener una parte de aminoácidos amino terminal o carboxi terminales, o incluso una región interna de la proteína, remplazada con un fragmento polipeptídico u otro resto, tal como biotina, que puede facilitar la purificación del VEGF modificado. Por ejemplo, un VEGF modificado puede fusionarse a una proteína de unión a maltosa, a través de química de péptidos o clonación de los respectivos ácidos nucleicos que codifican los dos fragmentos polipeptídicos en un vector de expresión de modo que la expresión de la región codificante produzca un polipéptido híbrido. El polipéptido híbrido puede purificarse por afinidad pasándolo sobre una columna de afinidad por amilosa, y el VEGF modificado después puede separarse de la región de unión a maltosa escindiendo el polipéptido híbrido con la proteasa específica factor Xa. (Véase, por ejemplo, New England Biolabs Product Catalog, 1996, pág. 164).

El análogo de VEGF de la invención puede ser un heterodímero o un homodímero. En una realización, el análogo de VEGF es una proteína de fusión que contiene una o más subunidades de VEGF. La proteína de fusión de VEGF de la invención puede ser una proteína de cadena sencilla que contiene dos o más subunidades de VEGF separadas por péptidos enlazadores. En otra realización, el análogo de VEGF de la invención es una proteína de fusión que contiene una o más subunidades de VEGF fusionadas a una toxina. El análogo de VEGF y la proteína de fusión de análogo de VEGF de la invención pueden aislarse y purificarse por medios conocidos en la técnica.

Todos los análogos de VEGF de la invención contiene al menos una sustitución de aminoácido básico en al menos una subunidad de VEGF, como se define en las reivindicaciones. En una realización de la invención, los análogos de VEGF de la invención contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos básicos, al menos 3 sustituciones de aminoácidos básicos, al menos 4 sustituciones de aminoácidos básicos o al menos 5 sustituciones de aminoácidos básicos en al menos una o al menos dos subunidades de VEGF.

La invención incluye análogos de VEGF que contienen fragmentos activos de VEGF, es decir, péptidos no son proteínas de longitud completa. Los fragmentos activos del VEGF modificado de la invención también pueden sintetizarse directamente u obtenerse por alteración química o mecánica de proteína VEGF modificada más grande. Un fragmento activo se define como una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 5 aminoácidos consecutivos, al menos 10 aminoácidos consecutivos, al menos 20 aminoácidos consecutivos, al menos 30 aminoácidos consecutivos, al menos 40 aminoácidos consecutivos, al menos 50 aminoácidos consecutivos, al menos 60 aminoácidos consecutivos, al menos 70 aminoácidos consecutivos, al menos 80 aminoácidos consecutivos, al menos 90 aminoácidos consecutivos, al menos 100 aminoácidos consecutivos, al menos 110 aminoácidos consecutivos, al menos 120 aminoácidos consecutivos, al menos 130 aminoácidos consecutivos, al menos 140 aminoácidos consecutivos, al menos 150 aminoácidos consecutivos, o al menos 160 aminoácidos consecutivos derivada de la secuencia natural de aminoácidos, que tiene la actividad relevante, por ejemplo, actividad de unión o reguladora. Los fragmentos, estén unidos o no a otras secuencias, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones, u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o restos de aminoácido específicos, con la condición de que la actividad del péptido no esté alterada o deteriorada significativamente en comparación con el VEGF modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar alguna propiedad adicional, tal como retirar/añadir aminoácidos capaces de formar enlaces disulfuro, aumentar su biolongoevidad y/o bioactividad, etcétera. En cualquier caso, el péptido debe poseer una propiedad bioactiva, tal como actividad de unión, regulación de unión al dominio de unión, etcétera. Las regiones funcionales o activas del VEGF pueden identificarse por mutagénesis de una región específica de la hormona, seguida de expresión y ensayo del polipéptido expresado. Dichos métodos son muy evidentes para un experto en la técnica y pueden incluir mutagénesis específica de sitio del ácido nucleico que codifica el receptor (Zoller, M. J. et al.).

Métodos de uso

La invención abarca métodos para reducir la angiogénesis mediada por VEGF, que comprende poner en contacto una célula que expresa un receptor de dominio quinasa (KDR) con los análogos de VEGF, incluyendo análogos de VEGF-A₁₆₅ y VEGF-A_{165b}, descritos en la presente memoria de modo que se reduzca la angiogénesis mediada por VEGF. Las células que expresan KDR a abordar por los métodos de la invención pueden incluir células procariotas o

eucariotas o ambas. Dichas células pueden mantenerse *in vitro*, o pueden estar presentes *in vivo*, por ejemplo en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer u otra enfermedad relacionada con angiogénesis.

La presente invención incluye métodos para tratar a un paciente diagnosticado con una enfermedad o afección relacionada con angiogénesis con una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los antagonistas del receptor de VEGF descritos en la presente memoria, que comprenden administrar dicho análogo o proteína de fusión de VEGF a dicho paciente de modo que dicha enfermedad o afección relacionada con angiogénesis se reduzca o inhiba. Para medir la reducción de la angiogénesis, pueden compararse los resultados del paciente con los de un paciente al que se ha administrado un placebo. Se describen en toda esta solicitud enfermedades ejemplares relacionadas con angiogénesis, e incluyen pero no se limitan a enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en tumores y neoplasias, hemangiomas, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis séptica, asma, aterosclerosis, fibrosis pulmonar idiopática, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas, meningioma, glaucoma neovascular, psoriasis, síndrome de Kaposi, angiofibroma, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, síndrome de Osier-Weber, granuloma piogénico, fibroplasia retrolental, esclerodermia, tracoma, enfermedad de von Hippel-Lindau, patologías de adhesión vascular, sinovitis, dermatitis, endometriosis, pterigión, retinopatía diabética, neovascularización asociada con lesiones o injertos de córnea, heridas, llagas, y úlceras (cutáneas, gástricas y duodenales).

Un paciente que padece una enfermedad causada por o exacerbada por un aumento en la angiogénesis, una disminución en la angiogénesis, o angiogénesis mal regulada de otro modo puede tratarse con un análogo de VEGF solo o en combinación con un antagonista conocido del receptor de VEGF, una terapia anti-angiogénesis, una terapia anti-neoplásica, u otra terapia conocida para tratar la enfermedad o afección. Como se usa en la presente memoria, "terapia" incluye pero no se limita a un fármaco conocido. Los antagonistas conocidos del receptor de VEGF o terapias anti-angiogénesis incluyen pero no se limitan a agentes que interrumpen la interacción VEGF/KDR y/o bloquean la vía de transducción de señales de KDR tales como péptidos que bloquean la unión de VEGF a KDR, anticuerpos contra VEGF, anticuerpos contra KDR, receptores solubles, inhibidores de tirosina quinasa, inmunotoxinas anti-VEGF, ribozimas, supresión de VEGF mediada por antisentido, y heparina dividida con glicol de bajo peso molecular infrasulfatada.

Si un análogo de VEGF de la invención se usa en combinación con otra terapia, el acoplamiento de las terapias provoca un efecto sinérgico. Además, un análogo de VEGF de la presente invención puede combinarse con un fármaco asociado con un efecto secundario indeseable. Acoplando un análogo de VEGF con dicho fármaco, la dosificación eficaz del fármaco con el efecto secundario puede disminuirse para reducir la probabilidad de que suceda el efecto secundario.

La invención incluye métodos para tratar a un paciente diagnosticado con cáncer con una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los antagonistas del receptor de VEGF descritos en la presente memoria, que comprenden administrar dicho antagonista a dicho paciente de modo que se reduzca o inhiba la propagación de dicho cáncer, es decir, se reduzca o inhiba la metástasis. La invención incluye métodos para tratar a un paciente diagnosticado con cáncer con una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los antagonistas del receptor de VEGF descritos en la presente memoria, que comprenden administrar dicho antagonista a dicho paciente de modo que se reduzca o inhiba el crecimiento de un tumor. En una realización, el análogo de VEGF funciona inhibiendo la angiogénesis mediante la reducción o prevención de la angiogénesis inducida por VEGF. En otra realización, el análogo de VEGF es una proteína de fusión de VEGF-toxina que evita o reduce la angiogénesis abordando o eliminando células tumorales, células vasculares tales como células endoteliales y/o receptores de VEGF.

Los cánceres que pueden tratarse por los métodos de la presente invención incluyen todos los tumores sólidos y cánceres metastásicos, incluyendo pero sin limitarse a los seleccionados del grupo que consiste en cánceres de vejiga, mama, hígado, hueso, riñón, colon, ovario, próstata, pancreáticos, de pulmón, cerebro y piel. La invención incluye pero no se limita a tratamiento de cáncer con un análogo de VEGF de la presente invención, solo, en combinación con quimioterapia, o en combinación con radioterapia por métodos conocidos en la técnica (véase la patente de Estados Unidos 6.596.712). Por ejemplo, puede usarse un análogo de VEGF con radiación con cesio, iridio, yodo, o cobalto.

La presente invención incluye métodos para tratar a un paciente diagnosticado con infertilidad con una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los antagonistas del receptor de VEGF descritos en la presente memoria, que comprenden administrar dicho antagonista a dicho paciente de modo que la infertilidad se considera tratada por un experto en la técnica. La infertilidad puede medirse por parámetros cuantitativos y cualitativos conocidos en la técnica tales como cantidad de ovocitos, tasa de fertilización, tasa de formación de blastocistos, y tasa de formación de embriones. Dichas enfermedades de infertilidad incluyen cualquier enfermedad asociada con la expresión de VEGF que compromete la fertilidad de un paciente incluyendo pero sin limitarse a infertilidad femenina inexplicada, endometriosis, e infertilidad masculina inexplicada. La invención incluye pero no se limita a tratamiento de infertilidad por administración de un análogo de VEGF solo o en combinación con otros tratamientos anti-VEGF, tratamientos anti-angiogénesis, y/o tratamientos para la infertilidad.

La presente invención también incluye métodos para tratar a un paciente diagnosticado con una enfermedad ocular asociada a angiogénesis con una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los antagonistas del receptor de

VEGF descritos en la presente memoria, que comprenden administrar dicho antagonista a dicho paciente de modo que dicha enfermedad ocular se reduzca o inhiba. Dichas enfermedades oculares incluyen cualquier enfermedad ocular asociada con neovascularización intraocular anormal, incluyendo pero sin limitarse a retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, oclusión de la vena retiniana, y degeneración macular relacionada con la edad. La invención incluye pero no se limita a tratamiento de enfermedades oculares asociadas a angiogénesis por administración de un análogo de VEGF solo o en combinación con otros tratamientos anti-VEGF, tratamientos anti-angiogénesis, y/u otros tratamientos de enfermedad ocular. Por ejemplo, un análogo de VEGF de la presente invención podría administrarse a un paciente junto con Macugen de Pfizer (pegaptanib) que es un aptámero pegilado anti-VEGF que actúa uniéndose a e inhibiendo la actividad de VEGF para el tratamiento de edema macular diabético, oclusión de la vena retiniana, y degeneración macular relacionada con la edad.

La presente invención también incluye métodos para tratar a un paciente diagnosticado con una afección inflamatoria asociada a angiogénesis o enfermedad autoinmune con una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los antagonistas del receptor de VEGF descritos en la presente memoria, que comprenden administrar dicho antagonista a dicho paciente de modo que dicha afección inflamatoria se reduzca o inhiba. Dichas afecciones o enfermedades inflamatorias incluyen cualquier trastorno inflamatorio asociado con la expresión de VEGF y la activación de células por VEGF, incluyendo pero sin limitarse a todos los tipos de artritis y particularmente artritis reumatoide y osteoartritis, asma, fibrosis pulmonar y dermatitis. La invención incluye pero no se limita a tratamiento de afecciones inflamatorias relacionadas con angiogénesis o enfermedades autoinmune por administración de un análogo de VEGF solo o en combinación con otros tratamientos anti-VEGF, tratamientos anti-angiogénesis, agentes terapéuticos para la inflamación, y/o agentes terapéuticos para enfermedades autoinmunes.

En otra realización de la presente invención, la proteína VEGF modificada de la invención se usa como agente de diagnóstico. Los análogos de VEGF de la invención o receptores de VEGF pueden presentarse en una superficie sintética, tal como en una serie de proteínas o péptidos. Dicha serie es bien conocida en la técnica y puede usarse para seleccionar análogos de VEGF que se unan a KDR y otros receptores que se sabe que están implicados en la angiogénesis. Los análogos de VEGF descritos en la presente memoria pueden usarse como controles positivos para evaluar la capacidad de análogos putativos de VEGF de unirse a KDR y otros receptores que se sabe que están implicados en angiogénesis. La invención también incluye una serie que comprende los análogos de VEGF de la presente invención para seleccionar receptores putativos de VEGF que pueden estar implicados en angiogénesis.

Se describen ensayos adecuados para caracterizar los análogos descritos en la presente memoria en el documento PCT/US/99/05908. Por ejemplo, pueden usarse diversos inmunoensayos incluyendo pero sin limitarse a ensayos de unión competitiva y sistemas de ensayo no competitivos usando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos tipo sándwich, ensayos inmuno-radiométricos, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ*, transferencias de western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos con Proteína A, y ensayos de inmunoelectroforesis, etcétera.

Formulaciones farmacéuticas

La invención proporciona métodos de diagnóstico y tratamiento por administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un agente terapéutico de la invención. El sujeto puede ser un animal, incluyendo pero sin limitarse a animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano. En una realización específica, un primate no humano es el sujeto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad eficaz de una o más proteínas VEGF modificadas de la presente invención en combinación con el vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden comprender adicionalmente otros fármacos conocidos adecuados para el tratamiento de la enfermedad particular que se esté abordando. Una cantidad eficaz del antagonista del receptor de VEGF de la presente invención es esa cantidad que bloquea, inhibe o reduce la estimulación por VEGF de células endoteliales en comparación con lo que sucedería en ausencia del compuesto; en otras palabras, una cantidad que disminuye la actividad angiogénica del endotelio, en comparación con lo que sucedería en ausencia del compuesto. La cantidad eficaz (y el modo de administración) se determinará en una base individual y se basará en el antagonista terapéutico específico del receptor de VEGF que se esté usando y consideraciones del sujeto (tamaño, edad, salud general), la afección que se esté tratando (cáncer, artritis, enfermedad ocular, etc.), la gravedad de los síntomas a tratar, el resultado buscado, el vehículo específico o formulación farmacéutica que se esté usando, la vía de administración, y otros factores que serían evidentes para los expertos en la técnica. La cantidad eficaz puede determinarla un experto en la técnica usando técnicas que son conocidas en la técnica. Las cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos descritos en la presente memoria pueden determinarse usando ensayos *in vitro*, modelos animales u otros estudios de respuesta a dosis, que son conocidos en la técnica. Las proteínas VEGF de la presente invención pueden usarse solas o junto con otras terapias. La cantidad terapéuticamente eficaz puede reducirse cuando se usa un análogo de VEGF junto con otra terapia.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse, envasarse, o venderse en formulaciones adecuadas para administración intradérmica, intravenosa, subcutánea, oral, rectal, vaginal, parenteral, intraperitoneal, tópica, pulmonar, intranasal, bucal, oftálmica, intratecal, epidural u otra vía de administración. Los

compuestos pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse localmente a un tumor mediante microinfusión. Además, la administración puede ser mediante una única dosis o una serie de dosis.

Para usos farmacéuticos, los análogos de VEGF de la presente invención pueden usarse en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y pueden incluir opcionalmente un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, los análogos de VEGF de la presente invención pueden usarse en combinación con otras terapias conocidas, incluyendo pero sin limitarse a terapias anti-VEGF, terapias anti-angiogénesis, terapias anti-neoplásicas, terapias para infertilidad, terapias para enfermedades autoinmunes, terapias para inflamación, terapias para enfermedades oculares, y terapias para enfermedades cutáneas.

La presente invención por tanto también proporciona composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. El vehículo puede ser un líquido, de modo que la composición se adapta para administración parenteral, o puede ser un sólido, es decir, un comprimido o píldora formulada para administración oral. Además, el vehículo puede estar en forma de un líquido o sólido nebulizable de modo que la composición se adapta para inhalación. Cuando se administra por vía parenteral, la composición debe estar libre de pirógenos y en un vehículo parenteral aceptable. Los compuestos activos pueden formularse o encapsularse, como alternativa, en liposomas, usando métodos conocidos. Otras formulaciones contempladas incluyen nanopartículas proyectadas y formulaciones basadas inmunológicamente.

Los liposomas son membranas de bicapa lipídica completamente cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas son vesículas que pueden ser unilamelares (membrana individual) o multilamelares (estructuras tipo cebolla caracterizadas por múltiples bicapas de membrana, cada una separada de la siguiente por una capa acuosa). La bicapa está compuesta por dos monocapas lipídicas que tienen una región de "cola" hidrófoba y una región de "cabeza" hidrófila. En la bicapa de membrana, las "colas" hidrófobas (no polares) de las monocapas lipídicas se orientan hacia el centro de la bicapa, mientras que las "cabezas" hidrófilas (polares) se orientan hacia la fase acuosa.

Los liposomas de la presente invención pueden formarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Pueden usarse varios métodos para formar los liposomas de la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse vesículas multilamelares (MLV), vesículas plurilamelares estables (SPLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV), o vesículas de evaporación de fase inversa (REV). Preferiblemente, sin embargo, se extruyen MLV a través de filtros formando vesículas unilamelares grandes (LUV) de tamaños dependientes del tamaño de filtro utilizado. En general, pueden usarse filtros de policarbonato de poros de 30, 50, 60, 100, 200 o 800 nm. En este método, descrito en Cullis et al., patente de Estados Unidos N° 5.008.050, cuyas partes relevantes se incorporan por referencia en la presente memoria, la suspensión de liposomas puede pasarse repetidamente a través del dispositivo de extrusión produciendo una población de liposomas de distribución homogénea de tamaño.

Por ejemplo, la filtración puede realizarse a través de un filtro de membrana directo (un filtro de policarbonato Nuclepore) o un filtro de paso tortuoso (p. ej., un filtro Nuclepore Membrafil (ésteres mixtos de celulosa) de 0,1 μ m de tamaño), o por técnicas alternativas de reducción de tamaño tales como homogenización. El tamaño de los liposomas puede variar de aproximadamente 0,03 hasta por encima de aproximadamente 2 micrómetros de diámetro; preferiblemente de aproximadamente 0,05 a 0,3 micrómetros y más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 micrómetros. El intervalo de tamaño incluye liposomas que son MLV, SPLV, o LUV.

Los lípidos que pueden usarse en las formulaciones de liposomas de la presente invención incluyen fosfolípidos sintéticos o naturales y pueden incluir fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI), esfingomielina (SPM) y cardiolipina, entre otros, solos o en combinación, y también en combinación con colesterol. Los fosfolípidos útiles en la presente invención también pueden incluir dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). En otras realizaciones, también puede usarse diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC). Asimismo pueden usarse dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y diaraquidinoilfosfatidilcolina (DAPC).

Durante la preparación de los liposomas, también pueden usarse disolventes orgánicos para suspender los lípidos. Los disolventes orgánicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen aquellos con una diversidad de polaridades y propiedades dieléctricas, que solubilizan los lípidos, por ejemplo, cloroformo, metanol, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de metileno, y mezclas de disolventes tales como benceno:metanol (70:30), entre otras. Como resultado, se forman soluciones (mezclas en que los lípidos y otros componentes están uniformemente distribuidos completamente) que contienen los lípidos. Los disolventes generalmente se eligen en base de su biocompatibilidad, baja toxicidad, y capacidad de solubilización.

Para encapsular el antagonista o antagonistas del receptor de VEGF de las invenciones en los liposomas, pueden usarse los métodos descritos en la patente de Estados Unidos N° 5.380.531, cuyas partes relevantes se incorporan

por referencia en la presente memoria, con el análogo o análogos de la presente invención.

Los liposomas que contienen el análogo o análogos de VEGF de la presente invención pueden usarse terapéuticamente en mamíferos, especialmente seres humanos, en el tratamiento de varias patologías o afecciones farmacológicas que requieren formulaciones de liberación sostenida así como administración repetida. El modo de administración de los liposomas que contienen los agentes de la presente invención puede determinar los sitios y células en el organismo al cual puede suministrarse el análogo de VEGF.

Los liposomas de la presente invención pueden administrarse solos pero generalmente se administrarán en mezcla con un vehículo farmacéutico seleccionado con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica convencional. Las preparaciones pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. Para administración parenteral, pueden usarse, por ejemplo, en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otros solutos, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer la solución isotónica, si se necesitara o deseara isotonicidad. Los liposomas de la presente invención también pueden emplearse por vía subcutánea o intramuscular. Los expertos en la técnica pueden prever otros usos, dependiendo de las propiedades particulares de la preparación.

Para el modo oral de administración, las formulaciones liposómicas de la presente invención pueden usarse en forma de comprimidos, cápsulas, grageas, trociscos, polvos, jarabes, elixires, soluciones y suspensiones acuosas, y similares. En el caso de comprimidos, los vehículos que pueden usarse incluyen lactosa, citrato sódico y sales de ácido fosfórico. Habitualmente se usan diversos disgregantes tales como almidón, agentes lubricantes, y talco en comprimidos. Para administración oral en forma de cápsula, son diluyentes útiles lactosa y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes y/o aromatizantes.

Para el modo tópico de administración, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden incorporarse en formas de dosificaciones tales como una solución, suspensión, gel, aceite, pomada o bálsamo, y similares. La preparación de dichas formulaciones tópicas se describe en la técnica de formulaciones farmacéuticas ejemplificada, por ejemplo, por Gennaro et al. (1995) Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing. Para aplicación tópica, las composiciones también podrían administrarse en forma de un polvo o pulverización, particularmente en forma de aerosol. Para la administración a seres humanos en el tratamiento de patologías o afecciones farmacológicas, el médico prescriptor determinará finalmente la dosificación apropiada del agente para un sujeto humano dado, y puede esperarse que ésta varíe de acuerdo con la edad, peso y respuesta del individuo así como la farmacocinética del agente usado.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden adicionalmente una formulación de depósito de biopolímeros tales como microesferas biodegradables. Las microesferas biodegradables se usan para controlar las tasas de liberación de fármaco y para dirigir los fármacos a sitios específicos en el organismo, optimizado de ese modo su respuesta terapéutica, disminuyendo los efectos secundarios tóxicos, y eliminando la inconveniencia de inyecciones repetidas. Las microesferas biodegradables tienen la ventaja sobre los implantes poliméricos grandes de que no requieren procedimientos quirúrgicos para su implante y retirada.

Las microesferas biodegradables usadas en el contexto de la invención se forman con un polímero que retarda la liberación de las proteínas y mantiene, en el sitio de acción, una concentración terapéuticamente eficaz durante un periodo prolongado de tiempo. El polímero puede elegirse entre etilcelulosa, poliestireno, poli(ϵ -caprolactona), poli(ácido láctico) y poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). El copolímero PLGA es uno de los polímeros sintéticos biodegradables y biocompatibles que tienen características reproducibles y de liberación lenta. Una ventaja de los copolímeros PLGA es que su tasa de degradación varía de meses a años y es una función del peso molecular del polímero y la proporción de restos de ácido poliláctico a ácido poliglicólico. Varios productos que usan PLGA para aplicaciones parenterales están actualmente en el mercado, incluyendo Lupron Depot y Zoladex en los Estados Unidos y Enantone Depot, Decapeptil, y Paridel LA en Europa (véase Yonsei, Med J. 2000 Dic.; 41(6): 720-34 para revisión).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse, envasarse o venderse adicionalmente en una formulación adecuada para administración nasal ya que se ha demostrado permeabilidad aumentada a través de la estrecha unión del epitelio nasal (Pietro y Woolley, The Science behind Natestech's intranasal drug delivery technology. Manufacturing Chemist, Agosto, 2003). Dichas formulaciones pueden comprender partículas secas que comprenden el ingrediente activo y que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 7 nanómetros, y preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 nanómetros. Dichas composiciones están convenientemente en forma de polvos secos para administración usando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al cual puede dirigirse una corriente de propulsor para dispersar el polvo o usando un recipiente de dispersión de disolvente/polvo auto-propulsado tal como un dispositivo que comprende el ingrediente activo disuelto o suspendido en un propulsor de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Preferiblemente, dichos polvos comprenden partículas en donde al menos el 98% de las partículas en peso tienen un diámetro mayor de 0,5 nanómetros y al menos el 95% de las partículas en número tienen un diámetro menor de 7 nanómetros. Más preferiblemente, al menos el 95% de las partículas en peso tienen un diámetro mayor de 1

nanómetro y al menos el 90% de las partículas en número tienen un diámetro menor de 6 nanómetros. Las composiciones de polvo seco preferiblemente incluyen un diluyente en polvo fino sólido tal como un azúcar y se proporcionan convenientemente en una forma monodosis.

Las composiciones farmacéuticas de la invención formuladas para suministro nasal también pueden proporcionar el ingrediente activo en forma de gotas de una solución o suspensión. Dichas formulaciones pueden prepararse, envasarse, o venderse como soluciones o suspensiones acuosas o alcohólicas diluidas, opcionalmente estériles, que comprenden el ingrediente activo, y pueden administrarse convenientemente usando cualquier dispositivo de nebulización o atomización. Dichas formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, un agente aromatizante tal como sacarina sódica, un aceite volátil, un agente tamponante, un agente tensioactivo, o un conservante tal como metilhidroxibenzoato. Las gotas proporcionadas por esta vía de administración preferiblemente tienen un diámetro promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros.

Otra formulación adecuada para administración intranasal es un polvo grueso que comprende el ingrediente activo y que tiene una partícula promedio de aproximadamente 0,2 a 500 micrómetros. Dicha formulación se administra del modo en que se toma rapé, es decir, por inhalación rápida a través de la fosa nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz.

Las formulaciones adecuadas para administración nasal pueden comprender, por ejemplo, aproximadamente tan poco como el 0,1% (p/p) y tanto como el 100% (p/p) del ingrediente activo, y pueden comprender adicionalmente uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse por inhalación. Para terapia por inhalación, los ingredientes activos pueden estar en una solución útil para administración por inhaladores de dosis medida o en una forma adecuada para un inhalador de polvo seco. En otra realización, las composiciones son adecuadas para administración por lavado bronquial.

Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen cápsulas de gelatina dura o blanda, píldoras, comprimidos, incluyendo comprimidos recubiertos, elixires, suspensiones, jarabes o inhalaciones y formas de liberación controlada de las mismas.

Los antagonistas del receptor de VEGF de la presente invención pueden administrarse de forma crítica (es decir, durante la aparición o poco después de los eventos que conduce a inflamación), o pueden administrarse durante el curso de una enfermedad degenerativa para reducir o mejorar la progresión de los síntomas que de lo contrario aparecerían. La cronología e intervalo de administración se varía de acuerdo con los síntomas del sujeto, y puede administrarse a un intervalo de varias horas a varios días, durante un curso de tiempo de horas, días, semanas o más, que lo determinaría un experto en la técnica. Un régimen diario típico puede ser de aproximadamente 0,01 µg/kg de peso corporal por día, de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por día, de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día, de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, y de aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día.

Los antagonistas del receptor de VEGF de la invención pueden administrarse por vía intravenosa, oral, intranasal, intraocular, intramuscular, intratecal, o por cualquier vía adecuada en vista de la proteína VEGF, la formación de proteína y la enfermedad a tratar. El VEGF modificado para el tratamiento de artritis inflamatoria puede inyectarse directamente en el fluido sinovial. El VEGF modificado para el tratamiento de tumores sólidos puede inyectarse directamente en el tumor. El VEGF modificado para el tratamiento de enfermedades cutáneas puede aplicarse de forma tópica, por ejemplo en forma de una loción o pulverización. La administración intratecal, es decir para el tratamiento de tumores cerebrales, puede comprender inyección directamente en el cerebro. Como alternativa, el VEGF modificado puede acoplarse o conjugarse a una segunda molécula (un "vehículo"), que es un péptido o resto no proteico seleccionado por su capacidad de penetrar la barrera hemato-encefálica y transportar el agente activo a través de la barrera hemato-encefálica. Se describen ejemplos de vehículos adecuados en las patentes de Estados Unidos N° 4.902.505; 5.604.198; y 5.017.566.

Un método alternativo para administrar los antagonistas del receptor de VEGF de la presente invención se realiza administrando al sujeto un vector que porta una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína VEGF modificada, donde el vector es capaz de dirigir la expresión y secreción de la proteína. Vectores adecuados son típicamente vectores virales, incluyendo virus ADN, virus ARN, y retrovirus. Las técnicas para utilizar sistemas de suministro de vector y realizar terapia génica son conocidas en la técnica (véase Lundstrom, 2003, Trends Biotechnol. 21(3):117-22, para una revisión reciente).

Animales transgénicos

Se contempla la producción de animales no humanos transgénicos que contienen una construcción de VEGF modificado con afinidad aumentada de unión al receptor y opcionalmente propiedades antagonistas en una realización de la presente invención.

La producción satisfactoria de animales no humanos transgénicos se ha descrito en varias patentes y publicaciones, tales como, por ejemplo la patente de Estados Unidos 6.291.740 (expedida el 18 de septiembre de 2001); la patente de Estados Unidos 6.281.408 (expedida el 28 de agosto de 2001); y la patente de Estados Unidos 6.271.436 (expedida el 7 de agosto de 2001).

La capacidad de alterar la composición genética de los animales, tales como mamíferos domesticados incluyendo vacas, cerdos, cabras, caballos, bovinos, y ovejas, permite varias aplicaciones comerciales. Estas aplicaciones incluyen la producción de animales que expresan grandes cantidades de proteínas exógenas en una forma fácilmente recogida (por ejemplo, expresión en la leche o la sangre), la producción de animales con aumento en la ganancia de peso, eficacia de cebado, composición del cuerpo, producción o contenido de leche, resistencia a enfermedades y resistencia a infección por microorganismos específicos y la producción de animales que tienen tasas de crecimiento o rendimiento reproductor potenciado. Los animales que contienen secuencias exógenas de ADN en su genoma se mencionan como animales transgénicos.

El método más ampliamente usado para la producción de animales transgénicos es la microinyección de ADN en los pronúcleos de embriones fertilizados (Wall et al., J. Cell. Biochem. 49:113 [1992]). Otros métodos para la producción de animales transgénicos incluyen la infección de embriones con retrovirus o con vectores retrovirales. Se ha informado de la infección de embriones de ratón tanto pre- como post-implante con retrovirus de tipo silvestre o recombinantes (Janenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260 [1976]; Janenich et al., Cell 24:519 [1981]; Stuhlmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7151 [1984]; Jahner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6927 [1985]; Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152 [1985]; Stewart et al., EMBO J. 6:383-388 [1987]).

Un medio alternativo para infectar embriones con retrovirus es la inyección de virus o células productoras de virus en el blastocelo de embriones de ratón (Jahner, D. et al., Nature 298:623 [1982]). Se ha informado de la introducción de transgenes en la línea germinal de ratones usando infección retroviral intrauterina del embrión de ratón a media gestación (Jahner et al., supra [1982]). Se ha informado de la infección de embriones bovinos y ovinos con retrovirus o vectores retrovirales para crear animales transgénicos. Estos protocolos implican la microinyección de partículas retrovirales o células con el crecimiento detenido (es decir, tratadas con mitomicina C) que desprenden partículas retrovirales en el espacio perivitelino de óvulos fertilizados o embriones precoces (solicitud internacional PCT WO 90/08832 [1990]; y Haskell y Bowen, Mol. Reprod. Dev., 40:386 [1995]). La solicitud internacional PCT WO 90/08832 describe la inyección de virus B de leucemia felina de tipo silvestre en el espacio perivitelino de embriones de oveja en la fase celular 2 a 8. Se demostró que fetos derivados de embriones inyectados contenían múltiples sitios de integración.

La patente de Estados Unidos 6.291.740 (expedida el 18 de septiembre de 2001) describe la producción de animales transgénicos mediante la introducción de ADN exógeno en ovocitos pre-maduración y ovocitos sin fertilizar maduros (es decir, ovocitos pre-fertilización) usando vectores retrovirales que transducen células vivas (por ejemplo, vectores derivados de virus de leucemia murina [MLV]). Esta patente también describe métodos y composiciones para la expresión dirigida por promotor de citomegalovirus, así como por LTR de tumor mamario de ratón de diversas proteínas recombinantes.

La patente de Estados Unidos 6.281.408 (expedida el 28 de agosto de 2001) describe métodos para producir animales transgénicos usando células madre embrionarias. En resumen, las células madre embrionarias se usan en un co-cultivo de células mixtas con una mórula para generar animales transgénicos. El material genético foráneo se introduce en las células madre embrionarias antes del co-cultivo por, por ejemplo, electroporación, microinyección o suministro retroviral. Las células ES transfectadas de este modo se seleccionan para las integraciones del gen mediante un marcador de selección tal como neomicina.

La patente de Estados Unidos 6.271.436 (expedida el 7 de agosto de 2001) describe la producción de animales transgénicos usando métodos que incluyen el aislamiento de células germinales primordiales, el cultivo de estas células para producir líneas celulares derivadas de células germinales primordiales, la transformación tanto de las células germinales primordiales como de las líneas celulares cultivadas, y el uso de estas células transformadas y líneas celulares para generar animales transgénicos. La eficacia a la cual los animales transgénicos se generan se aumenta enormemente, permitiendo de ese modo el uso de recombinación homóloga en la producción de especies animales transgénicas no de roedor.

Kits que contienen proteínas VEGF modificadas

En una realización adicional, la presente invención proporciona kits que contienen un análogo de VEGF y/o proteínas de fusión de análogo de VEGF, que pueden usarse, por ejemplo, para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas. El kit comprende un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente aloja una composición que incluye un análogo de VEGF o proteína de fusión de VEGF que es eficaz para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, tal como se ha descrito anteriormente. La etiqueta del recipiente indica que la composición se usa para una terapia específica o aplicación no terapéutica, y también puede indicar directrices para uso *in vivo* o *in vitro*, tal como los descritos anteriormente.

El kit de la invención típicamente comprenderá el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes diferentes que comprenden materiales deseable desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones para su uso. El kit de la invención también puede incluir un control que consiste en VEGF de tipo silvestre tal como VEGF₁₆₅ o VEGF_{165b} de tipo silvestre.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir e ilustrar la presente invención. Por tanto, no debe entenderse que limiten el alcance de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que muchas realizaciones diferentes también están dentro del alcance de la invención, que se describe en la presente memoria anteriormente y en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diseño de antagonistas del receptor de VEGF (no reivindicado)

Se diseñaron antagonistas de VEGF-A de la presente invención para aumentar la afinidad de unión al receptor y disminuir la bioactividad en comparación con VEGF-A de tipo silvestre. Un método por el cual se hizo esto fue añadiendo una carga positiva a los bucles de VEGF-A. Este enfoque para diseñar súper-antagonistas implica una combinación de diferentes métodos conocidos en la técnica incluyendo pero sin limitarse a modelado por homología, comparaciones de secuencia, mutagénesis por exploración de carga, y unión de monómero e introducción de mutaciones en el contexto de monómero unidos.

Vammin, o VEGF de veneno de serpiente, ha demostrado unirse a KDR-IgG con alta afinidad y estimula fuertemente la proliferación de células del endotelio vascular *in vitro* (véase Yamazaki et al., 2003, J. Biol. Chem. 278, 51985-51988). Se diseñaron antagonistas del receptor de VEGF-A en base a la homología de VEGF₁₆₅ con vammin. VEGF₁₆₅ tiene restos de glutamato en las posiciones 72 y 73, mientras que vammin contiene un resto de glicina y lisina en estas posiciones, respectivamente. Modificando VEGF-A para que contenga dos restos de aminoácido básico en las posiciones 72 y 73, el VEGF-A modificado demostró un aumento significativo en la afinidad de unión al receptor en comparación con VEGF-A de tipo silvestre (Figura 3A).

Ejemplo 2: Caracterización de antagonistas del receptor de VEGF

Se crearon los análogos de VEGF I83K, E44R, E72RE73R, E67K y Q87K y se ensayaron para su capacidad de unirse a KDR y de disminuir la proliferación celular en comparación con VEGF de tipo silvestre.

Métodos

Se incubaron análogos de VEGF expresados por células de levadura con KDR-Fc inmovilizado y se ensayó la capacidad de los análogos de unirse a KDR-Fc. El ensayo de unión se realizó del siguiente modo:

1. Se recubrieron microplacas de 96 pocillos Nunc MaxiSorp™ con 150 ng/pocillo de KDR-Fc (R&D System, Inc.) y 100 µl de tampón bicarbonato sódico 50 mM (Na₂CO₃ 15 mM + NaHCO₃ 35 mM) a pH 9,6. Se usó una placa diferente para cada análogo de VEGF y VEGF de tipo silvestre ensayado.

2. Las placas se incubaron a 4°C durante una noche.

3. El siguiente día, los pocillos se lavaron tres veces en tampón de lavado (tween al 0,05% en PBS).

4. Los pocillos se bloquearon con PBS con BSA al 3%, tween al 0,03% durante 1 hora a temperatura ambiente.

5. Después del bloqueo, los pocillos se lavaron tres veces en tampón de lavado (tween al 0,05% en PBS).

6. Se añadieron VEGF-A (de tipo silvestre o mutante) a diferentes concentraciones a los pocillos en 50 µl de tampón de unión (BSA al 1% y tween al 0,03% en PBS).

7. Se añadió VEGF-A (de tipo silvestre o mutante) marcado ¹²⁵I a 70.000 cpm/pocillo (PerkinElmer) a cada pocillo en 50 µl de tampón de unión (BSA al 1% y tween al 0,03% en PBS).

8. Los contenidos de los pocillos se mezclaron y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación lenta.

9. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (tween al 0,05% en PBS).

10. A cada pocillo, se añadieron 120 µl de tampón de lisis (NaOH 0,2 M + SDS al 0,5%). La placa se agitó vigorosamente durante 20 minutos a temperatura ambiente.

11. Se transfirió el tampón de lisis de cada pocillo a un tubo individual. Los pocillos se lavaron con tampón de lisis dos veces adicionales y se combinaron con el tampón de solución de lisis en el correspondiente tubo.

12. La medida de la unión para VEGF-A de tipo silvestre y diversos mutantes VEGF-A se determinó contando con un contador gamma.

La capacidad de células endoteliales HUVEC de proliferar en presencia de los análogos de VEGF se ensayó del siguiente modo:

- 5 1. Se sembraron células endoteliales HUVEC (pase 6) en placas de 96 pocillos a 3.000 células/pocillo usando Medio-200 con factores de crecimiento y se incubaron durante una noche.
2. Después de incubación durante una noche, se retiró el medio y se añadió Medio 199 (Invitrogen) con FBS de diálisis al 2% (Invitrogen).
3. Las células se incubaron durante 20 horas.
- 10 4. Se diluyeron en serie VEGF-A de tipo silvestre y análogos de VEGF-A en Medio 199 con FBS de diálisis al 2% en las placas de 96 pocillos, empezando a 200 ng/pocillo.
5. El medio se retiró de cada pocillo y se reemplazó con 200 μ l/pocillo de medio diluido de VEGF.
6. Las células se incubaron a 37°C durante 72 horas.
7. La proliferación celular se analizó usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® de Promega.
- 15 En resumen, se descongeló tampón CellTiter, se transfirió a sustrato CellTiter-Glo, y se mezcló bien para hacer la mezcla de sustrato. Se retiraron 100 μ l de medio de crecimiento de cada pocillo en una nueva placa de 96 pocillos y se mezclaron bien con 100 μ l de mezcla de sustrato. Las placas se agitaron durante 2 minutos y se incubaron a temperatura ambiente durante diez minutos adicionales.
- 20 8. Las placas se leyeron para la señal luminiscente usando un lector de placa con tiempo de integración establecido a 250mS (Tecan).

Análisis

- La afinidad de unión al receptor del análogo I83K a KDR-Fc fue ligeramente menor que la de VEGF-A de tipo silvestre (Figura 1A). Sin embargo, el análogo I83K demostró una disminución significativa en la proliferación de células endoteliales en comparación con VEGF-A de tipo silvestre (Figura 1B). Los análogos de VEGF-A E44R, EE72/73RR, E67K y Q87K demostraron todos un aumento en la afinidad de unión celular al receptor en comparación con VEGF-A de tipo silvestre (Figuras 2A, 3A, 4, 5 y 6). Sin embargo, los análogos E44R y EE72/73RR demostraron de poco a ningún cambio en la proliferación de células endoteliales (Figuras 2B y 3B). Estos resultados muestran que los análogos de VEGF₁₆₅ que comprenden I83K pueden funcionar de forma eficaz como un antagonista del receptor de VEGF-A. Además, aunque los análogos de VEGF-A E44R y EE72/73RR fueron incapaces de disminuir la proliferación de células endoteliales solos, cuando se añadían a I83K, estas modificaciones tienen el potencial de aumentar adicionalmente la afinidad de unión al receptor.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Trophogen, Inc.

<120> Análogos de VEGF y métodos de uso

<130> TROP-005/01WO

<150> US 60/808,106

<151> 2006-05-25

<150> US 60/723,917

<151> 06-10-2005

<160> 73

<170> PatentIn versión 3.3

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 576

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgcct tgctgctcta cctccaccat 60

gccaagtggg cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120

gtgaagttca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac 180

atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgccctg 240

atgcgatgcg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgccac tgaggagtcc 300

aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360

agcttcctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagaac aagacaagaa 420

aatccctgtg ggccttgctc agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg 480

tgtaaatggt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac 540

gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg cggtga 576

 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln

ES 2 533 466 T3

35	40	45
Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu		
50	55	60
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu		
65	70	75
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro		
85	90	95
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His		
100	105	110
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys		
115	120	125
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly		
130	135	140
Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr		
145	150	155
Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln		
165	170	175
Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg		
180	185	190

<210> 3
 5 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 3
 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala
 20 25

15 <210> 4
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 533 466 T3

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe
115 120 125

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
130 135 140

Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys
145 150 155 160

Asp Lys Pro Arg Arg
165

<210> 5
<211> 147
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 5
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

ES 2 533 466 T3

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Cys Asp Lys
130 135 140

Pro Arg Arg
145

5 <210> 6
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 6
Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

ES 2 533 466 T3

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Asn Cys Asp Lys Pro Arg Arg
115 120

5 <210> 7
<211> 171
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 7
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Cys Asp Lys Pro Arg Arg
165 170

15 <210> 8
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 533 466 T3

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys
115 120 125

Arg Lys Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Cys Asp Lys Pro Arg
130 135 140

Arg
145

<210> 9
<211> 174
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 9
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln

ES 2 533 466 T3

	35		40		45														
	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu			
	50						55					60							
	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	Pro	Leu			
	65					70				75					80				
	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro			
				85						90					95				
	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His			
				100					105					110					
	Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys			
		115						120					125						
	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Asn	Pro	Cys	Gly			
		130					135					140							
	Pro	Cys	Ser	Glu	Arg	Arg	Lys	His	Leu	Phe	Val	Gln	Asp	Pro	Gln	Thr			
	145					150					155				160				
	Cys	Lys	Cys	Ser	Cys	Lys	Asn	Thr	Asp	Ser	Arg	Cys	Lys	Met					
					165					170									
5	<210> 10 <211> 148 <212> PRT <213> Homo sapiens																		
10	<400> 10 Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys 1 5 10 15 Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu 20 25 30 Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys 35 40 45 Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu 50 55 60 Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile 65 70 75 80																		

ES 2 533 466 T3

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe
115 120 125

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
130 135 140

Arg Cys Lys Met
145

5 <210> 11
<211> 606
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10 <400> 11
atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgect tgctgctcta cctccaccat 60
gccaagtggc cccaggctgc acccatggca gaaggaggag gccagaatca tcacgaagtg 120
gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctgggtggac 180
atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg 240
atgcgatgcg ggggctgctg caatgacgag ggccctggagt gtgtgccac tgaggagtcc 300
aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360
agcttcttac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaga aagatagagc aagacaagaa 420
aatccctgtg ggccttgctc agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg 480
tgtaaatgtt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac 540
gaacgtactt gcagatctct caccaggaaa gactgatata gaacgatcga tacagaaacc 600
acgctg 606

15 <210> 12
<211> 191
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 12
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

ES 2 533 466 T3

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Ser Leu Thr Arg Lys Asp
180 185 190

<210> 13

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

ES 2 533 466 T3

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe
115 120 125

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
130 135 140

Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Ser
145 150 155 160

Leu Thr Arg Lys Asp
165

<210> 14

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

ES 2 533 466 T3

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Pro
145 150 155 160

Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro
165 170 175

Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala
180 185 190

Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg
195 200 205

Arg

<210> 15

<211> 183

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

10

ES 2 533 466 T3

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys
115 120 125

Arg Lys Lys Ser Arg Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His
130 135 140

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
145 150 155 160

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
165 170 175

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180

<210> 16

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

10

ES 2 533 466 T3

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His
165 170 175

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
180 185 190

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
195 200 205

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
210 215

<210> 17

<211> 189

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

10

ES 2 533 466 T3

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys
115 120 125

Arg Lys Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys
130 135 140

Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys
145 150 155 160

Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu
165 170 175

Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185

<210> 18

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

10

ES 2 533 466 T3

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
165 170 175

Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
180 185 190

His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
195 200 205

Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
210 215 220

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
225 230

<210> 19

<211> 206

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

ES 2 533 466 T3

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys
115 120 125

Arg Lys Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg
130 135 140

Cys Cys Leu Met Pro Trp Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro
145 150 155 160

Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
165 170 175

Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu
180 185 190

Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
195 200 205

<210> 20

<211> 576

<212> DNA

<213> Macaca fascicularis

<400> 20

atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgcct tgctgctgta cctccacccat 60

gccaagtggc cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120

gtgaagttca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac 180

atcttccagg agtaccctga tgagattgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg 240

atgcgatgtg ggggctgctg caatgacgag ggccctggagt gtgtgcccac tgaggagtcc 300

aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360

agcttccctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420

aatccctgtg ggccttgctc agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg 480

tgtaaatggt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac 540

gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg cggtga 576

<210> 21

<211> 191

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 21

ES 2 533 466 T3

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185 190

<210> 22

<211> 165

5 <212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 22

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

10

ES 2 533 466 T3

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

<210> 23
 <211> 573
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<400> 23
 atgaactttc tgctctcttg ggtacattgg agccttgccct tgctgctcta ccttcacccat 60
 gccaaagtggc cccaggctgc acccatggca gaaggagggc agaaacccca cgaagtgggtg 120
 aagttcatgg atgtctacca ggcagcttc tgccgtccca tcgagaccct ggtggacatc 180
 ttccaggagt acccagatga gattgagttc attttcaagc cgtcctgtgt gccctgatg 240
 cgggtcgggg gctgctgtaa tgacgaaagt ctggagtgtg tgcccactga ggagttcaac 300
 atcaccatgc agattatgcg gatcaaacct caccaaagcc agcacatagg agagatgagc 360
 ttcttacagc ataacaaatg tgaatgcaga ccaaagaaag ataaagcaag gcaagaaaat 420

ES 2 533 466 T3

ccctgtgggc cttgctcaga gcggagaaag catttgtttg tacaagatcc gcagacgtgt 480
 aaatgttcct gcaaaaacac agactgcgt tgcaaggcga ggcagcttga gttaaacgaa 540
 cgtacttgca gatgtgacaa gccgaggcgg tga 573

<210> 24
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 24
 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30
 Gly Gln Lys Pro His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 35 40 45
 Ser Phe Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Glu Ile Glu Phe Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
 65 70 75 80
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ser Leu Glu Cys Val Pro Thr
 85 90 95
 Glu Glu Phe Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 100 105 110
 Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
 115 120 125
 Cys Arg Pro Lys Lys Asp Lys Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro
 130 135 140
 Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu
 165 170 175
 Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190

<210> 25
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 25

ES 2 533 466 T3

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gln Lys Pro His Glu Val Val Lys Phe
1 5 10 15

Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Phe Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val
20 25 30

Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Phe Ile Phe Lys Pro
35 40 45

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ser
50 55 60

Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Phe Asn Ile Thr Met Gln Ile Met
65 70 75 80

Arg Ile Lys Pro His Gln Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu
85 90 95

Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Lys Ala Arg Gln
100 105 110

Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val
115 120 125

Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg
130 135 140

Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp
145 150 155 160

Lys Pro Arg Arg

<210> 26

<211> 645

5 <212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 26

atgaactttc tgctctcttg ggtgcattgg agccttgcct tgctgctcta cctccaccat 60

gccaaagtggg cccaggctgc gcctatggca ggaggagagc acaaacccca cgaagtgggt 120

10

ES 2 533 466 T3

```

aagttcatgg acgtctacca ggcagctac tgcggtccca ttgagacct ggtggacatc 180
ttccaggagt accctgacga gatcgagtac atcttcaagc catcctgcgt gccctgatg 240
cgggtgtggg gctgctgtaa tgatgagggc ctagagtgcg tgcccactga ggagttcaac 300
atcccatgc agattatgcg gatcaaacct catcaaggcc agcacatagg ggagatgagt 360
ttcctgcagc atagcaaattg tgaatgcaga ccaaagaaag atagagcaag gcaagaaaaa 420
aatcaattc gaggaagg gagggggcaa aaaagaaagc gcaagaaatc ccggtataaa 480
ccctggagcg ttccctgtgg gccttgctca gagcggagaa agcatttggt tgtacaagat 540
ccgcagacgt gtaaattgtc ctgcaaaaac acagactcgc gttgcaaggc gaggcagctt 600
gagttaaacg aacgtacttg cagatgtgac aagccgaggc ggtga 645

```

<210> 27

<211> 214

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 27

```

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1          5          10          15

```

```

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Gly Gly
20          25          30

```

```

Glu His Lys Pro His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
35          40          45

```

```

Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
50          55          60

```

```

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
65          70          75          80

```

```

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
85          90          95

```

```

Glu Glu Phe Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
100          105          110

```

```

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Ser Lys Cys Glu
115          120          125

```

```

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Ile Arg
130          135          140

```

ES 2 533 466 T3

Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr Lys
145 150 155 160

Pro Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu
165 170 175

Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp
180 185 190

Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg
195 200 205

Cys Asp Lys Pro Arg Arg
210

<210> 28

<211> 188

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 28

Ala Pro Met Ala Gly Gly Glu His Lys Pro His Glu Val Val Lys Phe
1 5 10 15

Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val
20 25 30

Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro
35 40 45

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly
50 55 60

Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Phe Asn Ile Thr Met Gln Ile Met
65 70 75 80

Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu
85 90 95

Gln His Ser Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln
100 105 110

Glu Lys Lys Ser Ile Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg
115 120 125

10

ES 2 533 466 T3

Lys Lys Ser Arg Tyr Lys Pro Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys Ser
130 135 140

Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys
145 150 155 160

Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu
165 170 175

Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185

<210> 29

<211> 651

5 <212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 29

atgaactttc tgctcacttg gatccactgg gggctggcgg cgctgctcta tctgcagagc 60
gcggagttgt cgaaggctgc tccggccctg ggggatgggg agcgggaagcc caacgaagtt 120
atcaaattcc tggaaagtcta cgaacgcagc ttctgcagga caattgagac cctggtggac 180
attttccagg agtacccctga tgaggtggag tacatatcca ggccatcctg tgtgctctg 240
atgagatgtg cgggttgctg cggcgatgag ggctagaat gtgtccctgt ggatgtgtac 300
aacgtcacga tggagatgc aagaattaaa cccatcaga gtcagcacat agcgacatg 360
agcttcttac agcacagtaa atgtgactgc agaccaaaga aagatgtcaa aaataaaca 420
gaaaaaaaaat caaagcgagg aaaggggaag ggtcaaaaga gaaagcgcaa gaaaggccgg 480
tacaaaccac ccagctttca ctgtgagcct tgcctagaga ggagaaagca cttgtttgta 540
caagatcccc agacctgtaa atgttctgc aaattcacag actcacgttg caagtcgagg 600
cagcttgagt taaacgagcg cacttgaga tgtgaaaaac cgagacggtg a 651

10

<210> 30

<211> 216

<212> PRT

<213> Gallus gallus

15

<400> 30

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

Tyr Leu Gln Ser Ala Glu Leu Ser Lys Ala Ala Pro Ala Leu Gly Asp
20 25 30

Gly Glu Arg Lys Pro Asn Glu Val Ile Lys Phe Leu Glu Val Tyr Glu

ES 2 533 466 T3

35	40	45
Arg Ser Phe Cys Arg Thr Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu		
50	55	60
Tyr Pro Asp Glu Val Glu Tyr Ile Phe Arg Pro Ser Cys Val Pro Leu		
65	70	75
Met Arg Cys Ala Gly Cys Cys Gly Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro		
	85	90
Val Asp Val Tyr Asn Val Thr Met Glu Ile Ala Arg Ile Lys Pro His		
	100	105
Gln Ser Gln His Ile Ala His Met Ser Phe Leu Gln His Ser Lys Cys		
	115	120
Asp Cys Arg Pro Lys Lys Asp Val Lys Asn Lys Gln Glu Lys Lys Ser		
	130	135
Lys Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Gly Arg		
	145	150
Tyr Lys Pro Pro Ser Phe His Cys Glu Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys		
	165	170
His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Phe		
	180	185
Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ser Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr		
	195	200
Cys Arg Cys Glu Lys Pro Arg Arg		
	210	215

<210> 31

<211> 190

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 31

Ala Pro Ala Leu Gly Asp Gly Glu Arg Lys Pro Asn Glu Val Ile Lys
1 5 10 15

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

ES 2 533 466 T3

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Val Glu Tyr Ile Phe Arg
35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Ala Gly Cys Cys Gly Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Val Asp Val Tyr Asn Val Thr Met Glu Ile
65 70 75 80

Ala Arg Ile Lys Pro His Gln Ser Gln His Ile Ala His Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Ser Lys Cys Asp Cys Arg Pro Lys Lys Asp Val Lys Asn
100 105 110

Lys Gln Glu Lys Lys Ser Lys Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg
115 120 125

Lys Arg Lys Lys Gly Arg Tyr Lys Pro Pro Ser Phe His Cys Glu Pro
130 135 140

Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
145 150 155 160

Lys Cys Ser Cys Lys Phe Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ser Arg Gln Leu
165 170 175

Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Glu Lys Pro Arg Arg
180 185 190

<210> 32
<211> 573
5 <212> DNA
<213> Equus caballus

<400> 32
atgaactttc tgctctcttg ggtgcattgg agccttgccct tgctgctcta cctccacccat 60
gccaagtgggt cccaggctgc acccatggca gaaggagagc ataaaacca tgaagtgggt 120
aagttcatgg acgtctacca ggcagctac tgccgtccaa tcgagaccct ggtggacatc 180
ttccaggagt acccogatga gatcgagtac atcttcaagc catcctgtgt gccctgatg 240
cgggtgtgggg gctgctgcaa cgacgagggc ctagagtgcg tgccactgc ggagttcaac 300
atcccatgc agattatgcg gatcaaaccct caccaaagcc aacacatagg agagatgagt 360
ttcctacagc atagcaaagt tgaatgcaga ccaaagaaag ataaagcaag gcaagaaaaat 420
10 ccctgtgggc cttgctcaga gcgagaaaag ctttgtttg tacaagatcc gcagacgtgt 480
aaatgttcct gcaaaaacac agactcgcgt tgcaaggcga ggcagcttga gttaaaccgaa 540
cgtacttgca gatgtgacaa gcgaggcgg tga 573

<210> 33

ES 2 533 466 T3

<211> 190
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

5 <400> 33
 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30
 Glu His Lys Thr His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 35 40 45
 Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
 65 70 75 80
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 85 90 95
 Ala Glu Phe Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 100 105 110
 Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Ser Lys Cys Glu
 115 120 125
 Cys Arg Pro Lys Lys Asp Lys Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro
 130 135 140
 Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu
 165 170 175
 Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190

<210> 34
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

<400> 34

ES 2 533 466 T3

Ala Pro Met Ala Glu Gly Glu His Lys Thr His Glu Val Val Lys Phe
1 5 10 15

Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val
20 25 30

Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro
35 40 45

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly
50 55 60

Leu Glu Cys Val Pro Thr Ala Glu Phe Asn Ile Thr Met Gln Ile Met
65 70 75 80

Arg Ile Lys Pro His Gln Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu
85 90 95

Gln His Ser Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Lys Ala Arg Gln
100 105 110

Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val
115 120 125

Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg
130 135 140

Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp
145 150 155 160

Lys Pro Arg Arg

<210> 35

<211> 573

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 35

atgaactttc tgctgtcttg ggtgcactgg accctggctt tactgctgta cctccaccat 60

gccaaagtggc cccaggctgc acccagcaca gaaggagagc agaagtccca tgaagtgatc 120

ES 2 533 466 T3

aagttcatgg acgtctacca gcgaagctac tgccgtccaa ttgagaccct ggtggacatc 180
 ttccaggagt acccogacga gatagagtac atcttcaagc cgtcctgtgt gccgctgatg 240
 cgctgtgcag gctgctgtaa cgatgaagcc ctggagtgcg tgcccacgtc agagagcaac 300
 atcaccatgc agatcatgcg gatcaaacct caccaaagcc agcacatagg agagatgagc 360
 ttctacagc acagccgatg tgaatgcaga ccaaagaaag acaggacaaa gccagaaaat 420
 cactgtgagc cttgttcaga gcggagaaaag catttggttg tccaagatcc gcagacgtgt 480
 aaatgttcct gcaaaaacac agactcgcgt tgcaaggcga ggcagcttga gttaaacgaa 540
 cgtacttgca gatgtgacaa gccgaggcgg tga 573

<210> 36

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Thr Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Thr Thr Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Lys Ser His Glu Val Ile Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 35 40 45

Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
 50 55 60

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
 65 70 75 80

Arg Cys Ala Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ala Leu Glu Cys Val Pro Thr
 85 90 95

Ser Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 100 105 110

Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Ser Arg Cys Glu
 115 120 125

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Thr Lys Pro Glu Lys Lys Ser Val Arg
 130 135 140

10

ES 2 533 466 T3

Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Phe Lys
145 150 155 160

Ser Trp Ser Val His Cys Glu Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu
165 170 175

Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp
180 185 190

Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg
195 200 205

Cys Asp Lys Pro Arg Arg
210

<210> 37

<211> 188

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Ala Pro Thr Thr Glu Gly Glu Gln Lys Ser His Glu Val Ile Lys Phe
1 5 10 15

Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val
20 25 30

Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro
35 40 45

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Ala Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ala
50 55 60

Leu Glu Cys Val Pro Thr Ser Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met
65 70 75 80

Arg Ile Lys Pro His Gln Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu
85 90 95

Gln His Ser Arg Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Thr Lys Pro
100 105 110

Glu Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg
115 120 125

Lys Lys Ser Arg Phe Lys Ser Trp Ser Val His Cys Glu Pro Cys Ser
130 135 140

ES 2 533 466 T3

Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys
145 150 155 160

Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu
165 170 175

Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185

<210> 38
<211> 573
<212> DNA
<213> Sus scrofa

<400> 38
atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgcct tgetgctcta cctccaccat 60
gccaagtggg cccaggctgc acccatggca gaaggagacc agaaaccca cgaagtgggt 120
aagttcatgg acgtctacca ggcagctac tgccgtccaa tcgagaccct ggtggacatc 180
ttocaggagt accccgatga gatcgagtac atcttcaagc cgtcctgtgt gccctgatg 240
cgggtgcgggg gctgctgcaa cgacgaaggt ctggagtgtg tgcccactga ggagttcaac 300
atcaccatgc agattatgcg gatcaaacct caccaaggcc agcacatagg agagatgagc 360
ttcctacagc acaacaaatg tgaatgcaga ccaaaagaaag atagagcgag gcaagaaaat 420
ccctgtgggc cttgctcaga gcggagaaaag catttgtttg tacaagatcc gcagacgtgt 480
aaatgttcct gcaaaaacac agactcgcgt tgcaaggcga ggcagcttga gttaaacgaa 540
cgtacttgca gatgtgacaa gccgaggcgg tga 573

<210> 39
<211> 190
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 39
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Asp Gln Lys Pro His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
35 40 45

Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr

ES 2 533 466 T3

50

55

60

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
65 70 75 80

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
85 90 95

Glu Glu Phe Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
100 105 110

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
115 120 125

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro
130 135 140

Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
145 150 155 160

Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu
165 170 175

Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185 190

<210> 40

<211> 164

5 <212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 40

Ala Pro Met Ala Glu Gly Asp Gln Lys Pro His Glu Val Val Lys Phe
1 5 10 15

Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val
20 25 30

Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro
35 40 45

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly
50 55 60

Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Phe Asn Ile Thr Met Gln Ile Met
65 70 75 80

10

ES 2 533 466 T3

Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu
85 90 95

Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln
100 105 110

Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val
115 120 125

Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg
130 135 140

Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp
145 150 155 160

Lys Pro Arg Arg

<210> 41

<211> 573

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 41

atgaactttc tgctctcttg ggtgcactgg accctggctt tactgctgta cctccaccat 60
gccaagtggg cccaggtgc acccagcaca gaaggggagc agaaagccca tgaagtggg 120
aagttcatgg acgtctacca ggcagctat tgccgtccga ttgagaccct ggtggacatc 180
ttccaggagt accccgatga gatagagtat atcttcaagc cgtcctgtgt gccctaagt 240
cgggtgtgcg gctgctgcaa tgatgaagcc ctggagtgcg tgcccacgto ggagagcaac 300
gtcactatgc agatcatgcg gatcaaacct caccaaagcc agcacatagg agagatgagc 360
ttcctgcagc atagcagatg tgaatgcaga ccaaagaaag atagaacaaa gccagaaaat 420
cactgtgagc cttgttcaga gcggagaaaag catttgtttg tccaagatcc gcagacgtgt 480
aaatgttcc tgcacaaacac agactcgcgt tgcaaggcga ggcagcttga gttaaacgaa 540
cgtacttgca gatgtgacaa gccaaggcgg tga 573

<210> 42

<211> 214

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 42

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Thr Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

ES 2 533 466 T3

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Thr Thr Glu Gly
20 25 30

Glu Gln Lys Ala His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
35 40 45

Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
50 55 60

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
65 70 75 80

Arg Cys Ala Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ala Leu Glu Cys Val Pro Thr
85 90 95

Ser Glu Ser Asn Val Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
100 105 110

Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Ser Arg Cys Glu
115 120 125

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Thr Lys Pro Glu Lys Lys Ser Val Arg
130 135 140

Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Phe Lys
145 150 155 160

Ser Trp Ser Val His Cys Glu Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu
165 170 175

Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp
180 185 190

Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg
195 200 205

Cys Asp Lys Pro Arg Arg
210

<210> 43

<211> 188

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 43

ES 2 533 466 T3

Ala Pro Thr Thr Glu Gly Glu Gln Lys Ala His Glu Val Val Lys Phe
1 5 10 15

Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val
20 25 30

Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro
35 40 45

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Ala Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ala
50 55 60

Leu Glu Cys Val Pro Thr Ser Glu Ser Asn Val Thr Met Gln Ile Met
65 70 75 80

Arg Ile Lys Pro His Gln Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu
85 90 95

Gln His Ser Arg Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Thr Lys Pro
100 105 110

Glu Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg
115 120 125

Lys Lys Ser Arg Phe Lys Ser Trp Ser Val His Cys Glu Pro Cys Ser
130 135 140

Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys
145 150 155 160

Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu
165 170 175

Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185

<210> 44

<211> 441

5 <212> DNA

<213> Ovis aries

<400> 44

atgaactttc tgctctcttg ggtgcattgg agccttgcct tgctgctcta ccttcacccat 60

gccaagtggc cccaggctgc acccatggca gaaggagggc agaaacccca tgaagtgatg 120

aagttcatgg atgtctacca ggcagcttc tgccgtccca ttgagaccct ggtggacatc 180

ttccaggagt acccagatga gattgagttc attttcaagc cgtcctgtgt gccoctgatg 240

10

ES 2 533 466 T3

cggtgcgggg gctgctgtaa tgacgaaagt ctggagtgtg tgccactga ggagttcaac 300
atcaccatgc agattatgcg gatcaaacct caccaaagcc agcacatagg agagatgagt 360
ttcctacagc ataacaaatg tgaatgcaga ccaaagaaag ataaagcaag gcaagaaaaa 420
tgtgacaagc cgaggcggtg a 441

<210> 45
<211> 146
<212> PRT
<213> Ovis aries

<400> 45
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30
Gly Gln Lys Pro His Glu Val Met Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
35 40 45
Ser Phe Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
50 55 60
Pro Asp Glu Ile Glu Phe Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
65 70 75 80
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ser Leu Glu Cys Val Pro Thr
85 90 95
Glu Glu Phe Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
100 105 110
Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
115 120 125
Cys Arg Pro Lys Lys Asp Lys Ala Arg Gln Glu Lys Cys Asp Lys Pro
130 135 140
Arg Arg
145

<210> 46
<211> 120
<212> PRT
<213> Ovis aries

<400> 46

ES 2 533 466 T3

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gln Lys Pro His Glu Val Met Lys Phe
1 5 10 15

Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Phe Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val
20 25 30

Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Phe Ile Phe Lys Pro
35 40 45

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ser
50 55 60

Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Phe Asn Ile Thr Met Gln Ile Met
65 70 75 80

Arg Ile Lys Pro His Gln Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu
85 90 95

Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Lys Ala Arg Gln
100 105 110

Glu Lys Cys Asp Lys Pro Arg Arg
115 120

<210> 47

<211> 188

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
20 25 30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
35 40 45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
50 55 60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65 70 75 80

10

ES 2 533 466 T3

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
85 90 95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
100 105 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
115 120 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro Arg
130 135 140

Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys Arg
145 150 155 160

Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
165 170 175

Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
180 185

<210> 48
<211> 167
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln Arg Lys Val Val Ser
1 5 10 15

Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln Pro Arg Glu Val Val
20 25 30

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

Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly Cys Cys Pro Asp Asp
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln Val Arg Met Gln Ile
65 70 75 80

Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly Glu Met Ser Leu Glu
85 90 95

Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Lys Asp Ser Ala Val

5

10

ES 2 533 466 T3

100

105

110

Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro Arg Cys Thr Gln His His
115 120 125

Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys Arg Cys Arg Arg Arg Ser
130 135 140

Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu Asn Pro Asp Thr Cys
145 150 155 160

Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
165

<210> 49

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
20 25 30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
35 40 45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
50 55 60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65 70 75 80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
85 90 95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
100 105 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
115 120 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg
130 135 140

5

10

ES 2 533 466 T3

Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala
165 170 175

His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala
180 185 190

Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
195 200 205

<210> 50

<211> 186

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln Arg Lys Val Val Ser
1 5 10 15

Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln Pro Arg Glu Val Val
20 25 30

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

Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly Cys Cys Pro Asp Asp
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln Val Arg Met Gln Ile
65 70 75 80

Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly Glu Met Ser Leu Glu
85 90 95

Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Lys Asp Ser Ala Val
100 105 110

Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg Pro Gln Pro Arg Ser
115 120 125

Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro Ser Pro Ala Asp Ile
130 135 140

Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala His Ala Ala Pro Ser

ES 2 533 466 T3

145 150 155 160

Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Asp Ala
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
180 185

<210> 51

<211> 419

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Phe
20 25 30

Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala
35 40 45

Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val Ser
50 55 60

Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met
65 70 75 80

Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln
85 90 95

Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala
100 105 110

His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys
115 120 125

Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe
130 135 140

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

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
165 170 175

10

ES 2 533 466 T3

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
180 185 190

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
195 200 205

Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile
210 215 220

Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn
225 230 235 240

Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys
245 250 255

Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser
260 265 270

Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu
275 280 285

Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys
290 295 300

Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys
305 310 315 320

Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu
325 330 335

Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro
340 345 350

Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys
355 360 365

Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr
370 375 380

Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser
385 390 395 400

Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro
405 410 415

Gln Met Ser

- 5 <210> 52
<211> 354
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 533 466 T3

<400> 52

Met Tyr Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val
1 5 10 15

Gln Leu Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser
20 25 30

Ser Gln Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu
50 55 60

Trp Arg Cys Arg Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg
65 70 75 80

Ser Ala Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile
85 90 95

Glu Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser
100 105 110

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

Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly
130 135 140

Cys Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr
145 150 155 160

Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro
165 170 175

Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu
180 185 190

Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln
195 200 205

ES 2 533 466 T3

Ile Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile
210 215 220

Asp Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu
225 230 235 240

Asn Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala
245 250 255

Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val
260 265 270

Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys
275 280 285

Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His
290 295 300

Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe
305 310 315 320

His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys
325 330 335

Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys
340 345 350

Asn Pro

<210> 53

<211> 149

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
20 25 30

Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
35 40 45

10

ES 2 533 466 T3

Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
50 55 60

Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
65 70 75 80

Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
85 90 95

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
100 105 110

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp
130 135 140

Ala Val Pro Arg Arg
145

<210> 54

<211> 131

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly
1 5 10 15

Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser
20 25 30

Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr Pro
35 40 45

Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu Arg
50 55 60

Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val Glu
65 70 75 80

Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg
85 90 95

Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu Cys
100 105 110

10

ES 2 533 466 T3

Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val
115 120 125

Pro Arg Arg
130

<210> 55
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe Leu Gln Leu Leu Ala Gly
1 5 10 15

Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
20 25 30

Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
50 55 60

Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
65 70 75 80

Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
85 90 95

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
100 105 110

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro
130 135 140

Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys
145 150 155 160

His Leu Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
165 170

<210> 56
<211> 152
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

ES 2 533 466 T3

Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly
1 5 10 15

Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser
20 25 30

Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr Pro
35 40 45

Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu Arg
50 55 60

Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val Glu
65 70 75 80

Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg
85 90 95

Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu Cys
100 105 110

Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro Lys Gly
115 120 125

Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
130 135 140

Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
145 150

<210> 57

<211> 221

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
20 25 30

10

ES 2 533 466 T3

Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
50 55 60

Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
65 70 75 80

Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
85 90 95

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
100 105 110

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
115 120 125

Glu Cys Arg His Ser Pro Gly Arg Gln Ser Pro Asp Met Pro Gly Asp
130 135 140

Phe Arg Ala Asp Ala Pro Ser Phe Leu Pro Pro Arg Arg Ser Leu Pro
145 150 155 160

Met Leu Phe Arg Met Glu Trp Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ser Gln Ser
165 170 175

Ala Val Trp Pro Ser Ser Pro Val Pro Glu Glu Ile Pro Arg Met His
180 185 190

Pro Gly Arg Asn Gly Lys Lys Gln Gln Arg Lys Pro Leu Arg Glu Lys
195 200 205

Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
210 215 220

<210> 58

<211> 203

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly
1 5 10 15

Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser

10

ES 2 533 466 T3

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

<210> 59
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe
 20 25 30

ES 2 533 466 T3

Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg
35 40 45

Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro
50 55 60

His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val
65 70 75 80

Glu Glu Asn Val Trp Ile Gln Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu
85 90 95

Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu
100 105 110

Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile Leu Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr
115 120 125

Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe
130 135 140

Val Ser Asp Glu Tyr-Phe Pro Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr
145 150 155 160

Asn Ile Val Met Pro Gln Phe Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu
165 170 175

Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala
180 185 190

Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu Ile Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Arg Trp
195 200 205

Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu Tyr Arg Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly
210 215 220

Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu
225 230 235 240

Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser
245 250 255

Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro
260 265 270

ES 2 533 466 T3

Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu
275 280 285

His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys
290 295 300

Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu
305 310 315 320

His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp
325 330 335

Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly
340 345

<210> 60

<211> 326

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe Ser Ser Asn
1 5 10 15

Lys Glu Gln Asn Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg Ile Ile Thr
20 25 30

Val Ser Thr Asn Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro His Thr Tyr
35 40 45

Pro Arg Asn Thr Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val Glu Glu Asn
50 55 60

Val Trp Ile Gln Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp Pro
65 70 75 80

Glu Asp Asp Ile Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu Pro Ser
85 90 95

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

Lys Gln Ile Ser Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe Val Ser Asp
115 120 125

Glu Tyr Phe Pro Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr Asn Ile Val
130 135 140

ES 2 533 466 T3

Met Pro Gln Phe Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu Pro Pro Ser
145 150 155 160

Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala Phe Ser Thr
165 170 175

Leu Glu Asp Leu Ile Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Arg Trp Gln Leu Asp
180 185 190

Leu Glu Asp Leu Tyr Arg Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly Lys Ala Phe
195 200 205

Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu Leu Thr Glu
210 215 220

Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser Val Ser Ile
225 230 235 240

Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro Gly Cys Leu
245 250 255

Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu His Asn Cys
260 265 270

Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys Tyr His Glu
275 280 285

Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu His Lys Ser
290 295 300

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

Arg Gly Ser Thr Gly Gly
325

<210> 61

<211> 147

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

ES 2 533 466 T3

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Cys Asp Lys
130 135 140 -

Pro Arg Arg
145

<210> 62

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

10

ES 2 533 466 T3

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Lys Cys Asp Lys Pro Arg Arg
115 120

<210> 63

<211> 211

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
1 5 10 15

His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
20 25 30

Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
35 40 45

Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg
50 55 60

Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
65 70 75 80

Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
85 90 95

Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
100 105 110

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

Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
130 135 140

Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
145 150 155 160

10

ES 2 533 466 T3

Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
165 170 175

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
180 185 190

Thr Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu
195 200 205

Lys Pro Thr
210

<210> 64

<211> 196

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
1 5 10 15

His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
20 25 30

Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
35 40 45

Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg
50 55 60

Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
65 70 75 80

Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
85 90 95

Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
100 105 110

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

Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
130 135 140

Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
145 150 155 160

10

ES 2 533 466 T3

Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
165 170 175

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
180 185 190

Thr Asp Val Arg
195

<210> 65

<211> 1338

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro
20 25 30

Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr
35 40 45

Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu Pro
50 55 60

Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala
65 70 75 80

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

Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val
100 105 110

Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile
115 120 125

Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
130 135 140

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
145 150 155 160

10

ES 2 533 466 T3

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
 165 170 175
 Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
 180 185 190
 Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
 195 200 205
 Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
 210 215 220
 Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val
 225 230 235 240
 Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr
 245 250 255
 Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys
 260 265 270
 Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His
 275 280 285 -
 Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys
 290 295 300
 Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys
 305 310 315 320
 Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
 325 330 335
 Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser
 340 345 350
 Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val
 355 360 365
 Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu
 370 375 380
 Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala
 385 390 395 400
 Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys

ES 2 533 466 T3

405	410	415
Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val	Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu	
420	425	430
Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp	Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser	
435	440	445
Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Ile	Pro Gln Pro Thr Ile	
450	455	460
Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys		
465	470	475
Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Ala Asp Ser		
485	490	495
Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln Arg Met Ala Ile Ile		
500	505	510
Glu Gly Lys Asn Lys Met Ala Ser Thr Leu Val Val Ala Asp Ser Arg		
515	520	525
Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser Asn Lys Val Gly Thr Val		
530	535	540
Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr Asp Val Pro Asn Gly Phe His		
545	550	555
Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly Glu Asp Leu Lys Leu Ser		
565	570	575
Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val Thr Trp Ile Leu Leu		
580	585	590
Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser Ile Ser Lys Gln Lys		
595	600	605
Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu Asn Leu Thr Ile Met		
610	615	620
Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala Cys Arg Ala Arg Asn		
625	630	635
Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys Lys Glu Ile Thr Ile Arg		
645	650	655

ES 2 533 466 T3

Asp Gln Glu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asp His Thr Val
 660 665 670
 Ala Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Asp Cys His Ala Asn Gly Val Pro
 675 680 685
 Glu Pro Gln Ile Thr Trp Phe Lys Asn Asn His Lys Ile Gln Gln Glu
 690 695 700
 Pro Gly Ile Ile Leu Gly Pro Gly Ser Ser Thr Leu Phe Ile Glu Arg
 705 710 715 720
 Val Thr Glu Glu Asp Glu Gly Val Tyr His Cys Lys Ala Thr Asn Gln
 725 730 735
 Lys Gly Ser Val Glu Ser Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Gly Thr Ser
 740 745 750
 Asp Lys Ser Asn Leu Glu Leu Ile Thr Leu Thr Cys Thr Cys Val Ala
 755 760 765
 Ala Thr Leu Phe Trp Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile Arg Lys Met Lys
 770 775 780
 Arg Ser Ser Ser Glu Ile Lys Thr Asp Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp
 785 790 795 800
 Pro Asp Glu Val Pro Leu Asp Glu Gln Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp
 805 810 815
 Ala Ser Lys Trp Glu Phe Ala Arg Glu Arg Leu Lys Leu Gly Lys Ser
 820 825 830
 Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Gln Ala Ser Ala Phe Gly
 835 840 845
 Ile Lys Lys Ser Pro Thr Cys Arg Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys
 850 855 860
 Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys
 865 870 875 880
 Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly
 885 890 895

ES 2 533 466 T3

Ala Cys Thr Lys Gln Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu Tyr Cys
900 905 910

Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu Phe
915 920 925

Phe Leu Asn Lys Asp Ala Ala Leu His Met Glu Pro Lys Lys Glu Lys
930 935 940

Met Glu Pro Gly Leu Glu Gln Gly Lys Lys Pro Arg Leu Asp Ser Val
945 950 955 960

Thr Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Ser Gly Phe Gln Glu Asp Lys Ser
965 970 975

Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Asp Ser Asp Gly Phe Tyr Lys Glu
980 985 990

Pro Ile Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg
995 1000 1005

Gly Met Glu Phe Leu Ser Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu
1010 1015 1020

Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val Lys Ile
1025 1030 1035

Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Pro Asp Tyr
1040 1045 1050

Val Arg Lys Gly Asp Thr Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro
1055 1060 1065

Glu Ser Ile Phe Asp Lys Ile Tyr Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp
1070 1075 1080

Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Ser
1085 1090 1095

Pro Tyr Pro Gly Val Gln Met Asp Glu Asp Phe Cys Ser Arg Leu
1100 1105 1110

Arg Glu Gly Met Arg Met Arg Ala Pro Glu Tyr Ser Thr Pro Glu
1115 1120 1125

ES 2 533 466 T3

Ile Tyr	Gln Ile Met Leu Asp	Cys Trp His Arg Asp	Pro Lys Glu
1130	1135	1140	
Arg Pro	Arg Phe Ala Glu Leu	Val Glu Lys Leu Gly	Asp Leu Leu
1145	1150	1155	
Gln Ala	Asn Val Gln Gln Asp	Gly Lys Asp Tyr Ile	Pro Ile Asn
1160	1165	1170	
Ala Ile	Leu Thr Gly Asn Ser	Gly Phe Thr Tyr Ser	Thr Pro Ala
1175	1180	1185	
Phe Ser	Glu Asp Phe Phe Lys	Glu Ser Ile Ser Ala	Pro Lys Phe
1190	1195	1200	
Asn Ser	Gly Ser Ser Asp Asp	Val Arg Tyr Val Asn	Ala Phe Lys
1205	1210	1215	
Phe Met	Ser Leu Glu Arg Ile	Lys Thr Phe Glu Glu	Leu Leu Pro
1220	1225	1230	
Asn Ala	Thr Ser Met Phe Asp	Asp Tyr Gln Gly Asp	Ser Ser Thr
1235	1240	1245	
Leu Leu	Ala Ser Pro Met Leu	Lys Arg Phe Thr Trp	Thr Asp Ser
1250	1255	1260	
Lys Pro	Lys Ala Ser Leu Lys	Ile Asp Leu Arg Val	Thr Ser Lys
1265	1270	1275	
Ser Lys	Glu Ser Gly Leu Ser	Asp Val Ser Arg Pro	Ser Phe Cys
1280	1285	1290	
His Ser	Ser Cys Gly His Val	Ser Glu Gly Lys Arg	Arg Phe Thr
1295	1300	1305	
Tyr Asp	His Ala Glu Leu Glu	Arg Lys Ile Ala Cys	Cys Ser Pro
1310	1315	1320	
Pro Pro	Asp Tyr Asn Ser Val	Val Leu Tyr Ser Thr	Pro Pro Ile
1325	1330	1335	

<210> 66

<211> 1356

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 533 466 T3

<400> 66

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
1 5 10 15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro
20 25 30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr
35 40 45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
50 55 60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser
65 70 75 80

Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn
85 90 95

Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser
100 105 110

Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser
115 120 125

Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys
130 135 140

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser
145 150 155 160

Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg
165 170 175

Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile
180 185 190

Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser
195 200 205

Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr
210 215 220

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
225 230 235 240

ES 2 533 466 T3

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

ES 2 533 466 T3

Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys
 485 490 495

Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys
 500 505 510

Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr
 515 520 525

Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser
 530 535 540

Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln
 545 550 555 560

Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser
 565 570 575

Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro
 580 585 590

Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr
 595 600 605

Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile
 610 615 620

Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr
 625 630 635 640

Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val
 645 650 655

Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn
 660 665 670

Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys
 675 680 685

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn
 690 695 700

Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg
 705 710 715 720

Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr

ES 2 533 466 T3

725										730					735				
Cys	Gln	Ala	Cys	Ser	Val	Leu	Gly	Cys	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	Phe	Phe				
			740					745					750						
Ile	Ile	Glu	Gly	Ala	Gln	Glu	Lys	Thr	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Ile	Leu				
		755					760					765							
Val	Gly	Thr	Ala	Val	Ile	Ala	Met	Phe	Phe	Trp	Leu	Leu	Leu	Val	Ile				
	770					775					780								
Ile	Leu	Arg	Thr	Val	Lys	Arg	Ala	Asn	Gly	Gly	Glu	Leu	Lys	Thr	Gly				
785					790					795					800				
Tyr	Leu	Ser	Ile	Val	Met	Asp	Pro	Asp	Glu	Leu	Pro	Leu	Asp	Glu	His				
				805					810					815					
Cys	Glu	Arg	Leu	Pro	Tyr	Asp	Ala	Ser	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Asp				
			820					825					830						
Arg	Leu	Lys	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Gln	Val				
	835						840					845							
Ile	Glu	Ala	Asp	Ala	Phe	Gly	Ile	Asp	Lys	Thr	Ala	Thr	Cys	Arg	Thr				
	850					855					860								
Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Thr	His	Ser	Glu	His	Arg				
865					870					875					880				
Ala	Leu	Met	Ser	Glu	Leu	Lys	Ile	Leu	Ile	His	Ile	Gly	His	His	Leu				
				885				890					895						
Asn	Val	Val	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Lys	Pro	Gly	Gly	Pro	Leu				
			900					905					910						
Met	Val	Ile	Val	Glu	Phe	Cys	Lys	Phe	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Tyr	Leu				
	915						920					925							
Arg	Ser	Lys	Arg	Asn	Glu	Phe	Val	Pro	Tyr	Lys	Thr	Lys	Gly	Ala	Arg				
	930					935					940								
Phe	Arg	Gln	Gly	Lys	Asp	Tyr	Val	Gly	Ala	Ile	Pro	Val	Asp	Leu	Lys				
945					950					955					960				
Arg	Arg	Leu	Asp	Ser	Ile	Thr	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Gly				
				965					970						975				

ES 2 533 466 T3

Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro
 980 985 990

Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr
 995 1000 1005

Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys
 1010 1015 1020

Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu
 1025 1030 1035

Lys Asn Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile
 1040 1045 1050

Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro
 1055 1060 1065

Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr
 1070 1075 1080

Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
 1085 1090 1095

Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu
 1100 1105 1110

Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro
 1115 1120 1125

Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp
 1130 1135 1140

His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Ser Glu Leu Val Glu
 1145 1150 1155

His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala Gln Gln Asp Gly Lys
 1160 1165 1170

Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu Ser Met Glu Glu
 1175 1180 1185

Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser Cys Met Glu
 1190 1195 1200

ES 2 533 466 T3

Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn Thr Ala
1205 1210 1215

Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg Pro
1220 1225 1230

Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu
1235 1240 1245

Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val
1250 1255 1260

Leu Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu
1265 1270 1275

Ser Pro Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser
1280 1285 1290

Val Ala Ser Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly
1295 1300 1305

Tyr His Ser Asp Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu
1310 1315 1320

Ala Glu Leu Leu Lys Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser
1325 1330 1335

Thr Ala Gln Ile Leu Gln Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser
1340 1345 1350

Pro Pro Val
1355

<210> 67

<211> 1298

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Met Gln Arg Gly Ala Ala Leu Cys Leu Arg Leu Trp Leu Cys Leu Gly
1 5 10 15

Leu Leu Asp Gly Leu Val Ser Gly Tyr Ser Met Thr Pro Pro Thr Leu
20 25 30

Asn Ile Thr Glu Glu Ser His Val Ile Asp Thr Gly Asp Ser Leu Ser

10

ES 2 533 466 T3

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

ES 2 533 466 T3

Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile His Asn Val Ser Gln His Asp
 290 295 300

Leu Gly Ser Tyr Val Cys Lys Ala Asn Asn Gly Ile Gln Arg Phe Arg
 305 310 315 320

Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Asn Pro Phe Ile Ser Val Glu
 325 330 335

Trp Leu Lys Gly Pro Ile Leu Glu Ala Thr Ala Gly Asp Glu Leu Val
 340 345 350

Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Glu Phe Gln Trp
 355 360 365

Tyr Lys Asp Gly Lys Ala Leu Ser Gly Arg His Ser Pro His Ala Leu
 370 375 380

Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Thr Gly Thr Tyr Thr Leu Ala
 385 390 395 400

Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Arg Asn Ile Ser Leu Glu Leu
 405 410 415

Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile His Glu Lys Glu Ala Ser Ser Pro
 420 425 430

Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Ala Leu Thr Cys Thr Ala Tyr
 435 440 445

Gly Val Pro Leu Pro Leu Ser Ile Gln Trp His Trp Arg Pro Trp Thr
 450 455 460

Pro Cys Lys Met Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln Gln
 465 470 475 480

Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg Ala Val Thr Thr Gln Asp
 485 490 495

Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr Trp Thr Glu Phe Val Glu
 500 505 510

Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile Gln Asn Ala Asn Val
 515 520 525

ES 2 533 466 T3

Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Ser Asn Lys Val Gly Gln Asp Glu
 530 535 540

Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro Asp Gly Phe Thr Ile
 545 550 555 560

Glu Ser Lys Pro Ser Glu Glu Leu Leu Glu Gly Gln Pro Val Leu Leu
 565 570 575

Ser Cys Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Tyr Glu His Leu Arg Trp Tyr Arg
 580 585 590

Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala His Gly Asn Pro Leu Leu Leu
 595 600 605

Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro Leu Ala Ala Ser Leu
 610 615 620

Glu Glu Val Ala Pro Gly Ala Arg His Ala Thr Leu Ser Leu Ser Ile
 625 630 635 640

Pro Arg Val Ala Pro Glu His Glu Gly His Tyr Val Cys Glu Val Gln
 645 650 655

Asp Arg Arg Ser His Asp Lys His Cys His Lys Lys Tyr Leu Ser Val
 660 665 670

Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn Leu Thr Asp Leu Leu
 675 680 685

Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Gln Cys Leu Val Ala Gly Ala
 690 695 700

His Ala Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Leu Leu Glu Glu
 705 710 715 720

Lys Ser Gly Val Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln Lys Leu Ser Ile Gln
 725 730 735

Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Val Cys Asn
 740 745 750

Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val Ala Val Glu Gly Ser
 755 760 765

ES 2 533 466 T3

Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu Val Gly Thr Gly Val
770 775 780

Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Phe Cys Asn Met
785 790 795 800

Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Ile
805 810 815

Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln Cys Glu Tyr Leu Ser
820 825 830

Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu Arg Leu His Leu Gly
835 840 845

Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Ser Ala
850 855 860

Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr Val Ala Val Lys Met
865 870 875 880

Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu
885 890 895

Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu Asn Val Val Asn Leu
900 905 910

Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu
915 920 925

Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu Arg Ala Lys Arg Asp
930 935 940

Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro Glu Gln Arg Gly Arg Phe
945 950 955 960

Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp Arg Arg Arg Pro Gly Ser
965 970 975

Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser Lys Thr Glu Gly Gly Ala
980 985 990

Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu Asp Leu Trp Leu Ser Pro
995 1000 1005

Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg

ES 2 533 466 T3

1010	1015	1020
Gly Met 1025	Glu Phe Leu Ala Ser 1030	Arg Lys Cys Ile His 1035
Ala Ala 1040	Arg Asn Ile Leu Leu 1045	Ser Glu Ser Asp Val 1050
Cys Asp 1055	Phe Gly Leu Ala Arg 1060	Asp Ile Tyr Lys Asp 1065
Val Arg 1070	Lys Gly Ser Ala Arg 1075	Leu Pro Leu Lys Trp 1080
Glu Ser 1085	Ile Phe Asp Lys Val 1090	Tyr Thr Thr Gln Ser 1095
Ser Phe 1100	Gly Val Leu Leu Trp 1105	Glu Ile Phe Ser Leu 1110
Pro Tyr 1115	Pro Gly Val Gln Ile 1120	Asn Glu Glu Phe Cys 1125
Arg Asp 1130	Gly Thr Arg Met Arg 1135	Ala Pro Glu Leu Ala 1140
Ile Arg 1145	Arg Ile Met Leu Asn 1150	Cys Trp Ser Gly Asp 1155
Arg Pro 1160	Ala Phe Ser Glu Leu 1165	Val Glu Ile Leu Gly 1170
Gln Gly 1175	Arg Gly Leu Gln Glu 1180	Glu Glu Glu Val Cys 1185
Arg Ser 1190	Ser Gln Ser Ser Glu 1195	Glu Gly Ser Phe Ser 1200
Thr Met 1205	Ala Leu His Ile Ala 1210	Gln Ala Asp Ala Glu 1215
Pro Ser 1220	Leu Gln Arg His Ser 1225	Leu Ala Ala Arg Tyr 1230
Val Ser 1235	Phe Pro Gly Cys Leu 1240	Ala Arg Gly Ala Glu 1245

ES 2 533 466 T3

Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Phe Pro Met Thr Pro Thr
1250 1255 1260

Thr Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val
1265 1270 1275

Leu Ala Ser Glu Glu Phe Glu Gln Ile Glu Ser Arg His Arg Gln
1280 1285 1290

Glu Ser Gly Phe Arg
1295

<210> 68

<211> 923

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Met Glu Arg Gly Leu Pro Leu Leu Cys Ala Val Leu Ala Leu Val Leu
1 5 10 15

Ala Pro Ala Gly Ala Phe Arg Asn Asp Lys Cys Gly Asp Thr Ile Lys
20 25 30

Ile Glu Ser Pro Gly Tyr Leu Thr Ser Pro Gly Tyr Pro His Ser Tyr
35 40 45

His Pro Ser Glu Lys Cys Glu Trp Leu Ile Gln Ala Pro Asp Pro Tyr
50 55 60

Gln Arg Ile Met Ile Asn Phe Asn Pro His Phe Asp Leu Glu Asp Arg
65 70 75 80

Asp Cys Lys Tyr Asp Tyr Val Glu Val Phe Asp Gly Glu Asn Glu Asn
85 90 95

Gly His Phe Arg Gly Lys Phe Cys Gly Lys Ile Ala Pro Pro Pro Val
100 105 110

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

Thr His Gly Ala Gly Phe Ser Ile Arg Tyr Glu Ile Phe Lys Arg Gly
130 135 140

ES 2 533 466 T3

Pro Glu Cys Ser Gln Asn Tyr Thr Thr Pro Ser Gly Val Ile Lys Ser
 145 150 155 160

Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Pro Asn Ser Leu Glu Cys Thr Tyr Ile
 165 170 175

Val Phe Ala Pro Lys Met Ser Glu Ile Ile Leu Glu Phe Glu Ser Phe
 180 185 190

Asp Leu Glu Pro Asp Ser Asn Pro Pro Gly Gly Met Phe Cys Arg Tyr
 195 200 205

Asp Arg Leu Glu Ile Trp Asp Gly Phe Pro Asp Val Gly Pro His Ile
 210 215 220

Gly Arg Tyr Cys Gly Gln Lys Thr Pro Gly Arg Ile Arg Ser Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Ile Leu Ser Met Val Phe Tyr Thr Asp Ser Ala Ile Ala Lys Glu
 245 250 255

Gly Phe Ser Ala Asn Tyr Ser Val Leu Gln Ser Ser Val Ser Glu Asp
 260 - 265 270

Phe Lys Cys Met Glu Ala Leu Gly Met Glu Ser Gly Glu Ile His Ser
 275 280 285

Asp Gln Ile Thr Ala Ser Ser Gln Tyr Ser Thr Asn Trp Ser Ala Glu
 290 295 300

Arg Ser Arg Leu Asn Tyr Pro Glu Asn Gly Trp Thr Pro Gly Glu Asp
 305 310 315 320

Ser Tyr Arg Glu Trp Ile Gln Val Asp Leu Gly Leu Leu Arg Phe Val
 325 330 335

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

Tyr Tyr Val Lys Thr Tyr Lys Ile Asp Val Ser Ser Asn Gly Glu Asp
 355 360 365

Trp Ile Thr Ile Lys Glu Gly Asn Lys Pro Val Leu Phe Gln Gly Asn
 370 375 380

Thr Asn Pro Thr Asp Val Val Val Ala Val Phe Pro Lys Pro Leu Ile

ES 2 533 466 T3

385		390		395		400
Thr Arg Phe Val Arg Ile Lys Pro Ala Thr Trp Glu Thr Gly Ile Ser	405		410		415	
Met Arg Phe Glu Val Tyr Gly Cys Lys Ile Thr Asp Tyr Pro Cys Ser	420		425		430	
Gly Met Leu Gly Met Val Ser Gly Leu Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr	435		440		445	
Ser Ser Asn Gln Gly Asp Arg Asn Trp Met Pro Glu Asn Ile Arg Leu	450		455		460	
Val Thr Ser Arg Ser Gly Trp Ala Leu Pro Pro Ala Pro His Ser Tyr	465		470		475	480
Ile Asn Glu Trp Leu Gln Ile Asp Leu Gly Glu Glu Lys Ile Val Arg	485		490		495	
Gly Ile Ile Ile Gln Gly Gly Lys His Arg Glu Asn Lys Val Phe Met	500		505		510	
Arg Lys Phe Lys Ile Gly Tyr Ser Asn Asn Gly Ser Asp Trp Lys Met	515		520		525	
Ile Met Asp Asp Ser Lys Arg Lys Ala Lys Ser Phe Glu Gly Asn Asn	530		535		540	
Asn Tyr Asp Thr Pro Glu Leu Arg Thr Phe Pro Ala Leu Ser Thr Arg	545		550		555	560
Phe Ile Arg Ile Tyr Pro Glu Arg Ala Thr His Gly Gly Leu Gly Leu	565		570		575	
Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ala Gly Pro	580		585		590	
Thr Thr Pro Asn Gly Asn Leu Val Asp Glu Cys Asp Asp Asp Gln Ala	595		600		605	
Asn Cys His Ser Gly Thr Gly Asp Asp Phe Gln Leu Thr Gly Gly Thr	610		615		620	
Thr Val Leu Ala Thr Glu Lys Pro Thr Val Ile Asp Ser Thr Ile Gln	625		630		635	640

ES 2 533 466 T3

Ser Glu Phe Pro Thr Tyr Gly Phe Asn Cys Glu Phe Gly Trp Gly Ser
645 650 655

His Lys Thr Phe Cys His Trp Glu His Asp Asn His Val Gln Leu Lys
660 665 670

Trp Ser Val Leu Thr Ser Lys Thr Gly Pro Ile Gln Asp His Thr Gly
675 680 685

Asp Gly Asn Phe Ile Tyr Ser Gln Ala Asp Glu Asn Gln Lys Gly Lys
690 695 700

Val Ala Arg Leu Val Ser Pro Val Val Tyr Ser Gln Asn Ser Ala His
705 710 715 720

Cys Met Thr Phe Trp Tyr His Met Ser Gly Ser His Val Gly Thr Leu
725 730 735

Arg Val Lys Leu Arg Tyr Gln Lys Pro Glu Glu Tyr Asp Gln Leu Val
740 745 750

Trp Met Ala Ile Gly His Gln Gly Asp His Trp Lys Glu Gly Arg Val
755 760 765

Leu Leu His Lys Ser Leu Lys Leu Tyr Gln Val Ile Phe Glu Gly Glu
770 775 780

Ile Gly Lys Gly Asn Leu Gly Gly Ile Ala Val Asp Asp Ile Ser Ile
785 790 795 800

Asn Asn His Ile Ser Gln Glu Asp Cys Ala Lys Pro Ala Asp Leu Asp
805 810 815

Lys Lys Asn Pro Glu Ile Lys Ile Asp Glu Thr Gly Ser Thr Pro Gly
820 825 830

Tyr Glu Gly Glu Gly Glu Gly Asp Lys Asn Ile Ser Arg Lys Pro Gly
835 840 845

Asn Val Leu Lys Thr Leu Glu Pro Ile Leu Ile Thr Ile Ile Ala Met
850 855 860

Ser Ala Leu Gly Val Leu Leu Gly Ala Val Cys Gly Val Val Leu Tyr
865 870 875 880

ES 2 533 466 T3

Cys Ala Cys Trp His Asn Gly Met Ser Glu Arg Asn Leu Ser Ala Leu
885 890 895

Glu Asn Tyr Asn Phe Glu Leu Val Asp Gly Val Lys Leu Lys Lys Asp
900 905 910

Lys Leu Asn Thr Gln Ser Thr Tyr Ser Glu Ala
915 920

<210> 69

<211> 931

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Met Asp Met Phe Pro Leu Thr Trp Val Phe Leu Ala Leu Tyr Phe Ser
1 5 10 15

Arg His Gln Val Arg Gly Gln Pro Asp Pro Pro Cys Gly Gly Arg Leu
20 25 30

Asn Ser Lys Asp Ala Gly Tyr Ile Thr Ser Pro Gly Tyr Pro Gln Asp
35 40 45

Tyr Pro Ser His Gln Asn Cys Glu Trp Ile Val Tyr Ala Pro Glu Pro
50 55 60

Asn Gln Lys Ile Val Leu Asn Phe Asn Pro His Phe Glu Ile Glu Lys
65 70 75 80

His Asp Cys Lys Tyr Asp Phe Ile Glu Ile Arg Asp Gly Asp Ser Glu
85 90 95

Ser Ala Asp Leu Leu Gly Lys His Cys Gly Asn Ile Ala Pro Pro Thr
100 105 110

Ile Ile Ser Ser Gly Ser Met Leu Tyr Ile Lys Phe Thr Ser Asp Tyr
115 120 125

Ala Arg Gln Gly Ala Gly Phe Ser Leu Arg Tyr Glu Ile Phe Lys Thr
130 135 140

Gly Ser Glu Asp Cys Ser Lys Asn Phe Thr Ser Pro Asn Gly Thr Ile
145 150 155 160

Glu Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Pro His Asn Leu Asp Cys Thr

5

10

ES 2 533 466 T3

165										170					175				
Phe	Thr	Ile	Leu	Ala	Lys	Pro	Lys	Met	Glu	Ile	Ile	Leu	Gln	Phe	Leu				
			180					185					190						
Ile	Phe	Asp	Leu	Glu	His	Asp	Pro	Leu	Gln	Val	Gly	Glu	Gly	Asp	Cys				
		195					200					205							
Lys	Tyr	Asp	Trp	Leu	Asp	Ile	Trp	Asp	Gly	Ile	Pro	His	Val	Gly	Pro				
	210					215					220								
Leu	Ile	Gly	Lys	Tyr	Cys	Gly	Thr	Lys	Thr	Pro	Ser	Glu	Leu	Arg	Ser				
225					230					235					240				
Ser	Thr	Gly	Ile	Leu	Ser	Leu	Thr	Phe	His	Thr	Asp	Met	Ala	Val	Ala				
				245					250					255					
Lys	Asp	Gly	Phe	Ser	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Val	His	Gln	Glu	Pro	Leu				
		260						265					270						
Glu	Asn	Phe	Gln	Cys	Asn	Val	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Gly	Arg	Ile				
		275					280					285							
Ala	Asn	Glu	Gln	Ile	Ser	Ala	Ser	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asp	Gly	Arg	Trp				
	290					295					300								
Thr	Pro	Gln	Gln	Ser	Arg	Leu	His	Gly	Asp	Asp	Asn	Gly	Trp	Thr	Pro				
305					310					315					320				
Asn	Leu	Asp	Ser	Asn	Lys	Glu	Tyr	Leu	Gln	Val	Asp	Leu	Arg	Phe	Leu				
				325					330					335					
Thr	Met	Leu	Thr	Ala	Ile	Ala	Thr	Gln	Gly	Ala	Ile	Ser	Arg	Glu	Thr				
			340					345					350						
Gln	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Val	Lys	Ser	Tyr	Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Thr	Asn				
		355					360					365							
Gly	Glu	Asp	Trp	Met	Val	Tyr	Arg	His	Gly	Lys	Asn	His	Lys	Val	Phe				
	370					375					380								
Gln	Ala	Asn	Asn	Asp	Ala	Thr	Glu	Val	Val	Leu	Asn	Lys	Leu	His	Ala				
385					390					395					400				
Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Phe	Val	Arg	Ile	Arg	Pro	Gln	Thr	Trp	His	Ser				
				405					410					415					

ES 2 533 466 T3

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

ES 2 533 466 T3

Trp Met Tyr Asp His Ala Lys Trp Leu Arg Thr Thr Trp Ala Ser Ser
 660 665 670
 Ser Ser Pro Asn Asp Arg Thr Phe Pro Asp Asp Arg Asn Phe Leu Arg
 675 680 685
 Leu Gln Ser Asp Ser Gln Arg Glu Gly Gln Tyr Ala Arg Leu Ile Ser
 690 695 700
 Pro Pro Val His Leu Pro Arg Ser Pro Val Cys Met Glu Phe Gln Tyr
 705 710 715 720
 Gln Ala Thr Gly Gly Arg Gly Val Ala Leu Gln Val Val Arg Glu Ala
 725 730 735
 Ser Gln Glu Ser Lys Leu Leu Trp Val Ile Arg Glu Asp Gln Gly Gly
 740 745 750
 Glu Trp Lys His Gly Arg Ile Ile Leu Pro Ser Tyr Asp Met Glu Tyr
 755 760 765
 Gln Ile Val Phe Glu Gly Val Ile Gly Lys Gly Arg Ser Gly Glu Ile
 770 775 780
 Ala Ile Asp Asp Ile Arg Ile Ser Thr Asp Val Pro Leu Glu Asn Cys
 785 790 795 800
 Met Glu Pro Ile Ser Ala Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Val Asp Ile
 805 810 815
 Pro Glu Ile His Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Asp Glu Ile Asp Asp Glu
 820 825 830
 Tyr Glu Val Asp Trp Ser Asn Ser Ser Ser Ala Thr Ser Gly Ser Gly
 835 840 845
 Ala Pro Ser Thr Asp Lys Glu Lys Ser Trp Leu Tyr Thr Leu Asp Pro
 850 855 860
 Ile Leu Ile Thr Ile Ile Ala Met Ser Ser Leu Gly Val Leu Leu Gly
 865 870 875 880
 Ala Thr Cys Ala Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Thr Cys Ser Tyr Ser Gly
 885 890 895

ES 2 533 466 T3

Leu Ser Ser Arg Ser Cys Thr Thr Leu Glu Asn Tyr Asn Phe Glu Leu
900 905 910

Tyr Asp Gly Leu Lys His Lys Val Lys Met Asn His Gln Lys Cys Cys
915 920 925

Ser Glu Ala
930

5 <210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 70
Ser Leu Thr Arg Lys Asp
1 5

15 <210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 71
Cys Asp Lys Pro Arg Arg
1 5

25 <210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 72
Ala Asn Ile Thr Val
1 5

35 <210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73
Ala Asn Ile Thr Val Asn Ile Thr Val
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) modificado que comprende al menos una mutación que causa que el VEGF modificado actúe como un antagonista del receptor, en donde la mutación provoca una disminución en la bioactividad en comparación con VEGF de tipo silvestre, y en donde la mutación es una sustitución de aminoácido básico en una posición correspondiente a la posición 83 de la SEC ID N° 4, en donde la sustitución se selecciona del grupo que consiste en I83K e I83R.
2. El antagonista del receptor de VEGF de la reivindicación 1, en donde el antagonista comprende una o más sustituciones adicionales de aminoácidos básicos correspondientes al grupo que consiste en las posiciones 44, 67, 72, 73 y 87 de la SEC ID N°4, en donde la sustitución adicional es una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en E72R, E73R, E72K, E73K, E44R, E44K, Q87K, Q87L y E67K.
3. El antagonista del receptor de VEGF de las reivindicaciones 1 y 2 que comprende adicionalmente una o más mutaciones que alteran la unión a neurofilina-1, y que comprende adicionalmente una o más sustituciones de aminoácidos básicos seleccionadas del grupo que consiste en E44, E67, E72, y Q87 de la SEC ID N° 4.
4. El antagonista del receptor de VEGF de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el antagonista comprende una o más sustituciones adicionales de aminoácidos en aminoácidos correspondientes a las posiciones 111-165 de la SEC ID N° 4 que alteran la unión a neurofilina-1, en donde la sustitución está en la posición correspondiente a C146 o C160 de la SEC ID N° 4 y en donde la sustitución se selecciona del grupo que consiste en C146S y C160S.
5. El antagonista del receptor de VEGF de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el antagonista comprende una o más sustituciones adicionales de aminoácidos que reducen o evitan la escisión por proteasa del antagonista, en donde la una o más sustituciones adicionales de aminoácidos se seleccionan del grupo de posiciones correspondientes a las posiciones A111 y A148 de la SEC ID N°4, en donde la sustitución es una o más seleccionadas del grupo que consiste en A111P y A148P.
6. El antagonista del receptor de VEGF de la reivindicación 1, en donde el antagonista se expresa como proteína de fusión que comprende una o más subunidades de VEGF, en donde el antagonista del receptor de VEGF comprende adicionalmente una toxina.
7. El antagonista del receptor de VEGF de la reivindicación 1, en donde el antagonista se expresa como un homodímero o heterodímero, en donde una o ambas subunidades del homodímero o heterodímero contiene al menos una mutación.
8. El antagonista del receptor de VEGF de la reivindicación 6, en donde la toxina se selecciona del grupo que consiste en exotoxina de *Pseudomonas* (PE), una toxina de Difteria (DT), toxina ricina, toxina abrina, toxina ántrax, toxina shiga, toxina de botulismo, toxina tetánica, toxina de cólera, maitotoxina, palitoxina, ciguatoxina, textilotoxina, batracotoxina, conotoxina alfa, taipoxina, tetrodotoxina, alfa toxina tityus, saxitoxina, anatoxina, microcistina, aconitina, toxinas exfoliatina A, exfoliatina B, una enterotoxina, toxina de síndrome de choque tóxico (TSST-1), toxina de *Y. pestis* y toxina de gangrena gaseosa.
9. El antagonista del receptor de VEGF de las reivindicaciones 7 y 8, en donde al menos una de dichas subunidades es una subunidad de VEGF-A, una subunidad de VEGF-B, una subunidad de VEGF-C, una subunidad de VEGF-D o una subunidad de PlGF, en donde dicha subunidad de VEGF-A se selecciona del grupo que consiste en VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, y VEGF₂₀₆.
10. El antagonista del receptor de VEGF de las reivindicaciones 1-9, en donde la angiogénesis está al menos parcialmente inhibida.
11. El antagonista del receptor de VEGF de la reivindicación 1, en donde una o ambas subunidades del VEGF comprenden una modificación para prolongar la semivida, en donde la modificación para prolongar la semivida es una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en una extensión N terminal, una extensión C-terminal y pegilación.
12. El antagonista del receptor de VEGF de la reivindicación 1, en donde el antagonista del receptor de VEGF es antagonista del receptor de VEGF_{165b} que comprende una o más mutaciones adicionales seleccionadas del grupo que consiste en E44B, E67B, E72B, E73B, y Q87B de la SEC ID N° 13, en donde B es un aminoácido básico.
13. Una composición farmacéutica que comprende el antagonista del receptor de VEGF de las reivindicaciones 1-12.
14. Una composición farmacéutica que comprende el antagonista del receptor de VEGF de las reivindicaciones 1-12 para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con
 - a) cáncer, en donde dicho cáncer es un cáncer de tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en de vejiga, mama, hígado, hueso, riñón, colon, ovario, próstata, pancreático, de pulmón, cerebro, y piel; o
 - b) una enfermedad ocular asociada a angiogénesis, en donde la enfermedad ocular asociada a angiogénesis se

selecciona del grupo que consiste en retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, oclusión de la vena retiniana, degeneración macular, y neovascularización; o

- 5 c) una enfermedad o afección relacionada con angiogénesis, en donde la afección relacionada con angiogénesis se selecciona del grupo que consiste en hemangiomas, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis séptica, asma, aterosclerosis, fibrosis pulmonar idiopática, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas, meningiomas, glaucoma neovascular, psoriasis, síndrome de Kaposi, angiofibroma, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, síndrome de Osier-Weber, granuloma piogénico, fibroplasia retrolental, esclerodermia, tracoma, enfermedad de von-Hippel-Lindau, patologías de adhesión vascular, sinovitis, dermatitis, infertilidad femenina inexplicada, endometriosis, infertilidad masculina inexplicada, pterigión, heridas, llagas, úlceras cutáneas, úlceras gástricas, y úlceras duodenales.
- 10

Figura 1A

Unión de VEGF mutante y WT a KDR-Fc inmovilizado

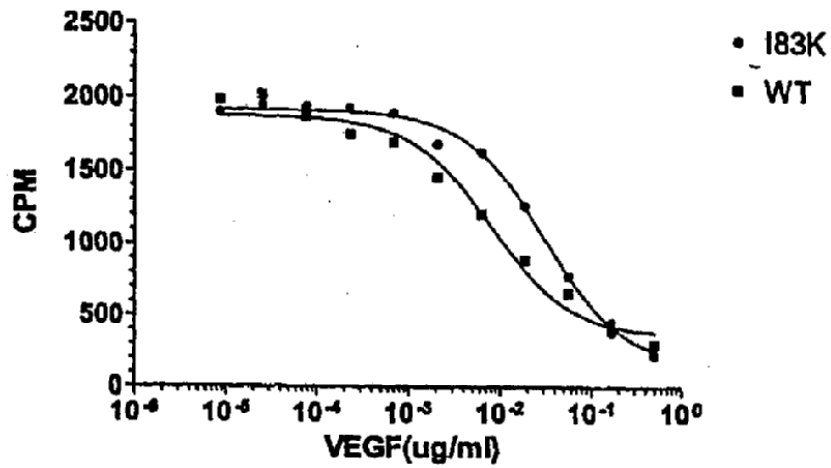


Figura 1B

Ensayo-Glo de proliferación de células HUVEC-2

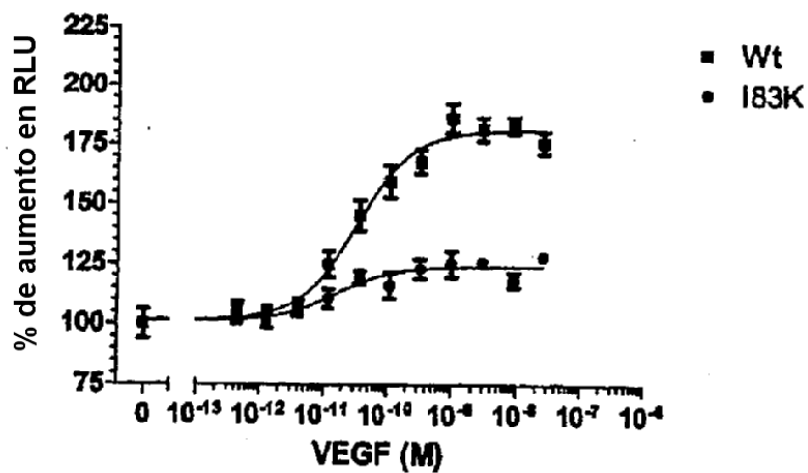


Figura 2A

Ensayo de unión de mutantes de VEGF de levadura

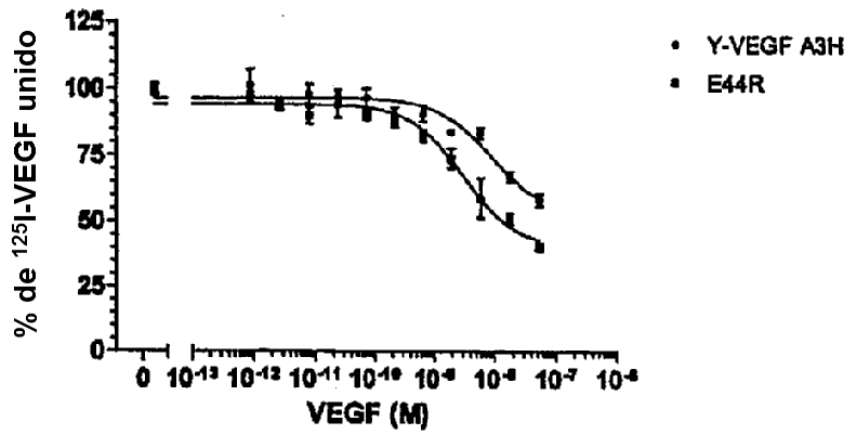


Figura 2B

Ensayo-Glo de proliferación de células HUVEC-2

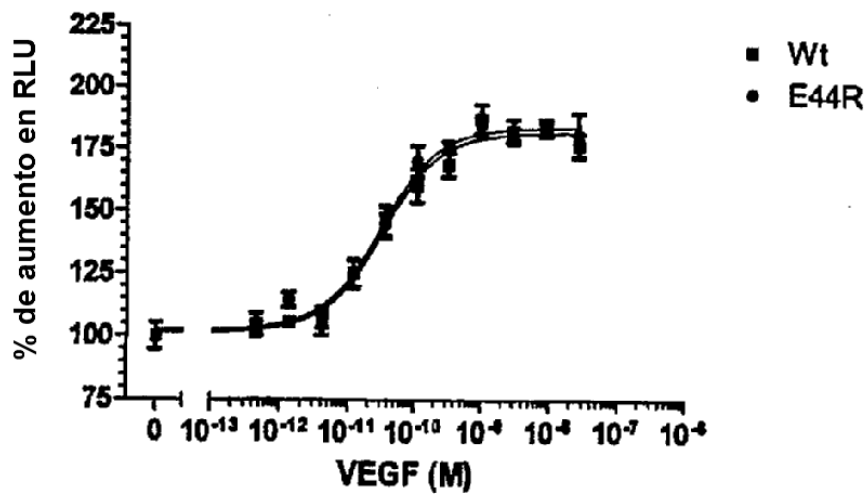


Figura 3A

Ensayo de unión de mutantes de VEGF de levadura

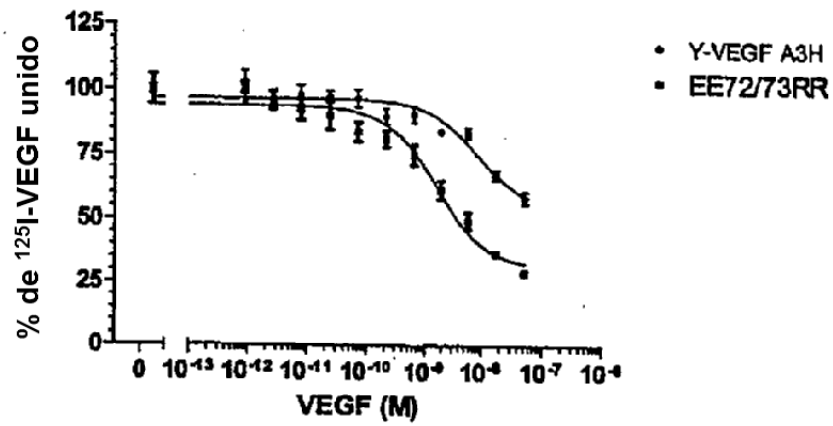


Figura 3B

Ensayo-Glo de proliferación de células HUVEC-2

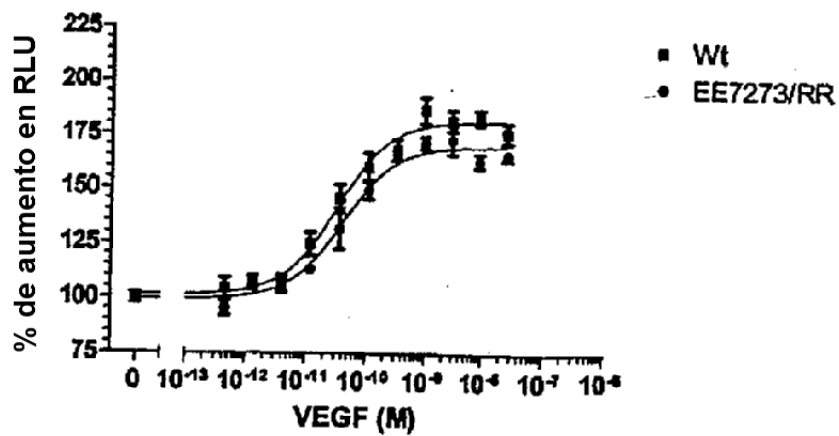


Figura 4
Unión competitiva de VEGF a KDR-Fc
para E44R y EE72/73RR

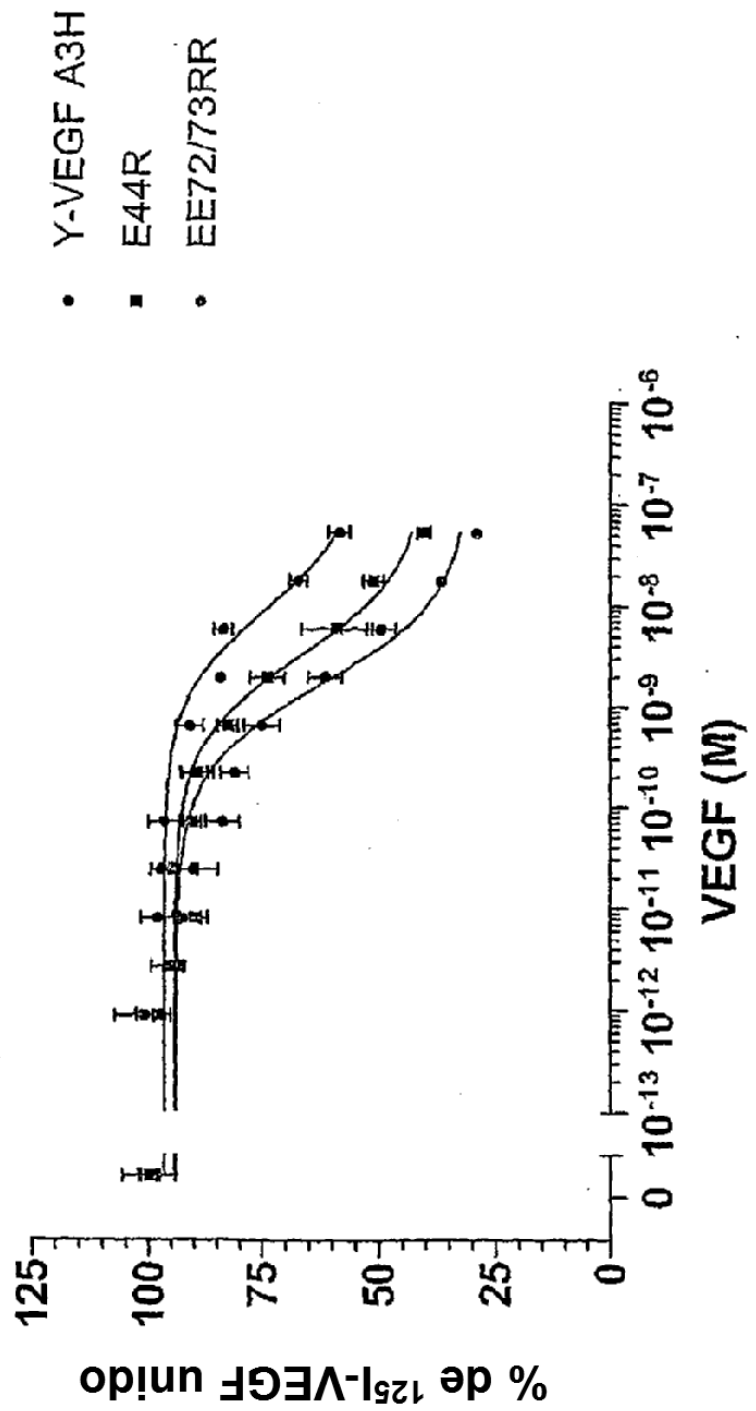


Figura 5
Ensayo de unión a KDR de construcción de levadura

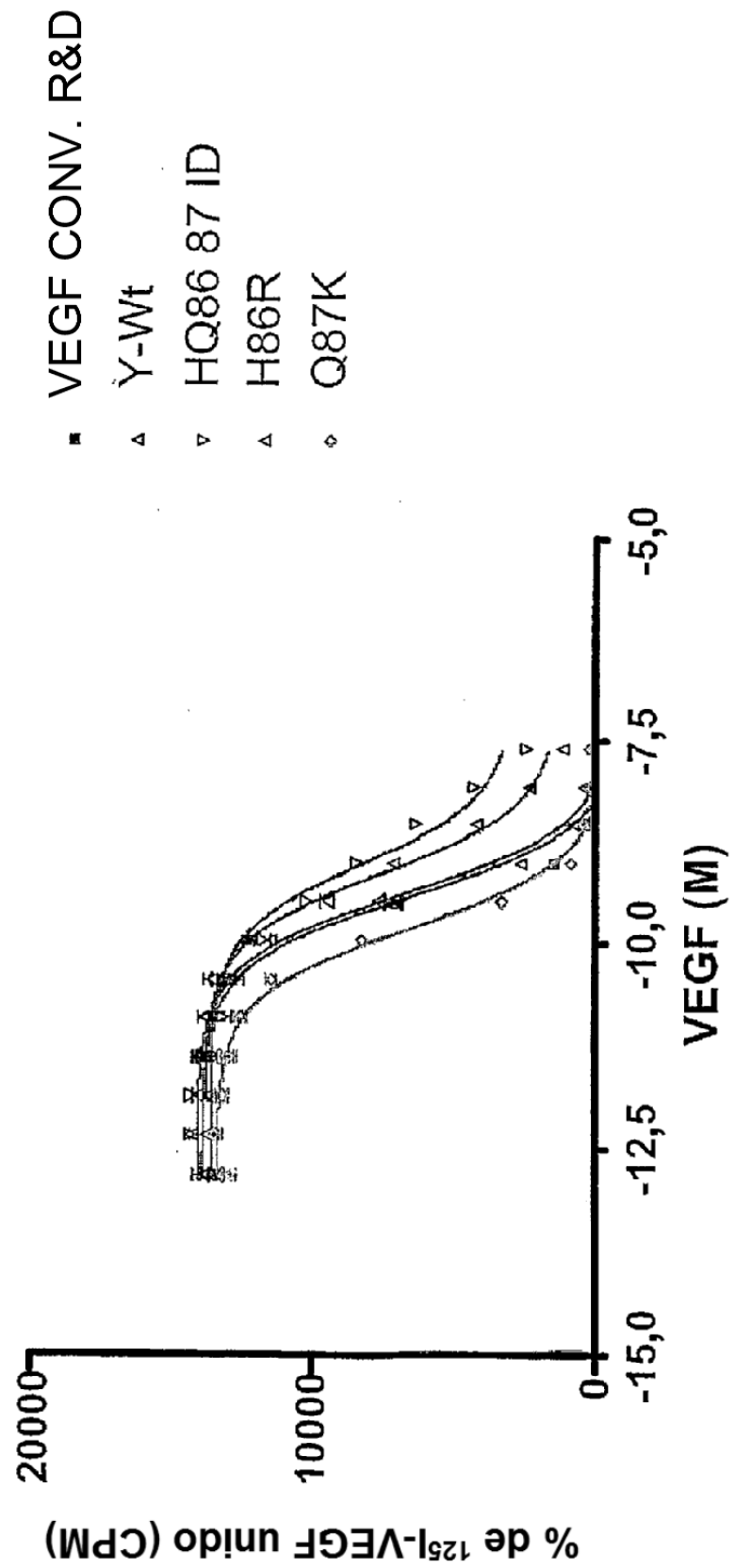


Figura 6

Ensayo de unión a KDR de construcción de levadura

