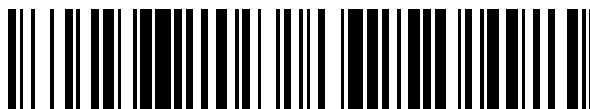


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 634**

51 Int. Cl.:

A61K 38/38 (2006.01)

C07K 14/76 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2005 E 05722848 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 1729795**

54 Título: **Proteínas de fusión de albúmina**

30 Prioridad:

09.02.2004 US 542274 P

05.03.2004 US 549901 P

29.03.2004 US 556906 P

17.12.2004 US 636603 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2016

73 Titular/es:

**HUMAN GENOME SCIENCES, INC. (100.0%)
Corporation Service Company 2711 Centerville
Road, Suite 400
Wilmington, DE 19808, US**

72 Inventor/es:

**ROSEN, CRAIG, A.;
HASELTINE, WILLIAM, A.;
MOORE, PAUL, A.;
BOCK, JASON, B.;
LAFLEUR, DAVID y
RUBEN, STEVEN M.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 567 634 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

Proteínas de fusión de albúmina

Referencia a la lista de secuencias en disco compacto

Esta solicitud se refiere a una "Lista de Secuencias" enumerada más abajo, que se proporciona como un documento electrónico en tres discos compactos idénticos (CD-R), marcados como "Copia 1", "Copia 2," y "Copia 3." Estos discos compactos contienen, cada uno, el archivo "PF612PCT SL.txt" (929.048 bytes, creado el 7 de Febrero de 2005), que se incorpora como referencia en su totalidad.

Antecedentes de la invención

La invención se refiere en general a proteínas Terapéuticas (incluyendo, pero no limitadas a, al menos un polipéptido, anticuerpo, péptido, o fragmento y variante del mismo) fusionadas a albúmina o fragmentos o variantes de albúmina. La invención incluye polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina, proteínas de fusión de albúmina terapéuticas, composiciones, composiciones farmacéuticas, formulaciones y kits. Las células anfitrionas transformadas con los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina terapéuticas también están incluidas en la invención, como los métodos para elaborar las proteínas de fusión de albúmina de la invención utilizando estos polinucleótidos, y/o células anfitrionas.

La albúmina de suero humana (HSA, o HA), una proteína de 585 aminoácidos en su forma madura (como se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1)), es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también funciona como portador de ligandos endógenos y exógenos. En la actualidad, la HA para uso clínico es producida mediante extracción a partir de sangre humana. La producción de HA recombinante (rHA) en microorganismos ha sido descrita en el documento EP 330 451 y en el documento EP 361 991.

Las proteínas terapéuticas en su estado nativo o cuando son producidas recombinantemente, tales como los interferones y las hormonas de crecimiento, son típicamente moléculas lábiles que muestran vidas útiles cortas, particularmente cuando se formulan en disoluciones acuosas. La inestabilidad de estas moléculas cuando se formulan para la administración dicta que muchas moléculas deban ser liofilizadas y refrigeradas en todo momento durante el almacenamiento, haciendo de ese modo que las moléculas sean difíciles de transportar y/o almacenar. Los problemas de almacenamiento son particularmente agudos cuando las formulaciones farmacéuticas deben ser almacenadas y dispensadas fuera del entorno hospitalario.

Se han propuesto algunas soluciones prácticas para los problemas de almacenamiento de las moléculas de proteína lábiles. Por consiguiente, existe la necesidad de formulaciones de larga duración, estabilizadas de moléculas terapéuticas proteináceas que sean fácilmente dispensadas, preferiblemente con una formulación simple que requiera una manipulación post-almacenamiento mínima.

Tras la administración *in vivo*, las proteínas terapéuticas en su estado nativo o cuando son producidas recombinantemente, tales como interferones y hormonas de crecimiento, muestran una breve estabilidad en plasma debido al rápido aclaramiento del torrente sanguíneo. Por consiguiente, los efectos terapéuticos proporcionados por estas proteínas también son efímeros. De este modo, con el fin de mantener su efecto terapéutico deseado *in vivo*, el rápido aclaramiento de la sangre de estas proteínas dicta que las moléculas terapéuticas deban ser administradas más frecuentemente o a una dosis superior. No obstante, el incremento del programa de dosificación para la administración de la proteína terapéutica a menudo da como resultado un aumento de las reacciones en los sitios de inyección, de los efectos secundarios, y de la toxicidad en el paciente. De un modo similar, la administración de la proteína terapéutica a una dosis más alta normalmente también da como resultado un aumento de la toxicidad y de los efectos secundarios en el paciente.

Las pocas soluciones prácticas para incrementar la estabilidad en plasma de las moléculas terapéuticas que se han propuesto, incluyendo la conjugación química, han proporcionado beneficios limitados al paciente. Generalmente, en la mayoría de los casos, estas moléculas terapéuticas químicamente modificadas todavía se administran con un programa de dosificación frecuente, manteniendo reacciones significativas en los sitios de inyección, efectos secundarios, y toxicidad en los pacientes. Por consiguiente, existe la necesidad de una forma estabilizada de moléculas terapéuticas que mantengan una mayor estabilidad en plasma *in vivo* que el agente terapéutico nativo o producido de manera recombinante solo y se puedan administrar menos frecuentemente, disminuyendo de ese modo los efectos secundarios potenciales para el paciente.

Compendio de la invención

La presente invención incluye proteínas de fusión de albúmina que comprenden dos o más polipéptidos de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1) orientados en tándem en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387; (b) una variante de (a) que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1 fusionado a una albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1: o una variante de

albúmina cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en donde la proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia líder HAS/KEX 2 modificada del SEQ ID NO: 112. La presente invención también incluye polinucleótidos que comprenden, o alternatively consisten en, moléculas de ácido nucleico que codifican dos o más polipéptidos de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1) orientados en tándem en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387; (b) una variante de (a) que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1 fusionado a una albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1: o una variante de albúmina cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en donde la proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia líder HAS/KEX 2 modificada del SEQ ID NO: 112. La presente invención también incluye polinucleótidos, que comprenden, o alternatively consisten en, moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas que comprenden las proteínas de fusión de albúmina de la invención, lo que es suficiente para prolongar la vida útil de la proteína de polipéptido GLP-1, para incrementar la estabilidad en plasma del polipéptido GLP-1 en comparación con su estado no fusionado, y/o estabilizar el polipéptido GLP-1 n y/o su actividad en disolución (o en una composición farmacéutica) *in vitro* y/o *in vivo*. Las proteínas de fusión de albúmina codificadas por un polinucleótido de la invención también están incluidas en la invención, al igual que las células anfitrionas transformadas con los polinucleótidos de la invención, y los métodos de elaboración de las proteínas de fusión de albúmina de la invención y la utilización de estos polinucleótidos de la invención, y/o células anfitrionas.

Asimismo se describen, proteínas de fusión de albúmina descritas en la Tabla 2 y los polinucleótidos que codifican tales proteínas.

La invención también incluye formulaciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de albúmina de la invención y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Tales formulaciones pueden estar en un kit o recipiente. Semejantes kit o recipiente pueden estar empaquetados con las instrucciones pertinentes a la vida útil prolongada del polipéptido GLP-1. Tales formulaciones se pueden utilizar en métodos de tratamiento, prevención, alivio o diagnóstico de una enfermedad o síntoma de enfermedad en un paciente, preferiblemente un mamífero, muy preferiblemente un ser humano, que comprende la etapa de administrar la formulación farmacéutica al paciente.

Asimismo se describen métodos de prevención, tratamiento, o alivio de una enfermedad o trastorno, incluyendo un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno enumerados en la Tabla 1 que comprenden administrar a un paciente en el que se desea semejante tratamiento, prevención o alivio una proteína de fusión de albúmina de la invención en una cantidad eficaz para tratar, prevenir o aliviar la enfermedad o trastorno.

En una realización, una proteína de fusión de albúmina descrita en la Tabla 1 o 2 tiene una vida útil prolongada.

En una segunda realización, una proteína de fusión de albúmina descrita en la Tabla 1 o 2 es más estable que la correspondiente molécula terapéutica no fusionada descrita en la Tabla 1.

También se describen organismos transgénicos modificados para que contengan moléculas de ácido nucleico de la invención (incluyendo, pero no limitados a, los polinucleótidos descritos en las Tablas 1 y 2), preferiblemente modificados para expresar una proteína de fusión de albúmina de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 A-D muestra la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la albúmina humana (SEQ ID NO: 1) y un polinucleótido que la codifica (SEQ ID NO: 2). Los nucleótidos 1 a 1755 del SEQ ID NO: 2 codifican la forma madura de la albúmina humana (SEQ ID NO: 1).

La Figura 2 muestra el mapa de restricción del vector de clonación pPPC0005, depósito de la ATCC PTA-3278.

La Figura 3 muestra el mapa de restricción del vector de expresión de la levadura *S. cerevisiae* pSAC35 (Sleep et al., BioTechnology 8:42 (1990)).

La Figura 4 muestra el efecto de diversas diluciones de las proteínas de fusión de IFN γ y albúmina codificadas por el ADN comprendido en CID 2011 y 2053 sobre la actividad SEAP en células indicadoras ISRE-SEAP/293F (véase el Ejemplo 76). Las proteínas se diluyeron seriamente de 10^{-7} a 10^{-14} g/ml en DMEM/FBS al 10% y se utilizaron para tratar las células indicadoras ISRE-SEAP/293F. Después de 24 horas los sobrenadantes se separaron de las células informadoras y se analizaron para determinar la actividad SEAP. La proteína de fusión de IFN γ y albúmina se purificó a partir de tres clones estables: 293F/núm. 2011, CH0/núm. 2011 y NS0/núm. 2053. El IFN γ derivado de mamífero, Avonex, procedía de Biogen y se informó de que tenía una actividad específica de 2.0×10^5 UI/ μ g.

La Figura 5 compara la actividad anti-proliferativa de la proteína de fusión de albúmina e IFN codificada por CID 3165 (proteína CID 3165) e IFN α recombinante (rIFN α) sobre células de melanoma Hs294T. Las células se cultivaron con concentraciones variables de proteína CID 3165 o rIFN α y se midió la proliferación mediante la incorporación de BrdU después de 3 días de cultivo. La proteína CID 3165 causó una inhibición medible de la proliferación celular a concentraciones por encima de 10 ng/ml con una inhibición de 50% lograda a

aproximadamente 200 ng/ml. (■) = proteína CID 3165, (◆) = rIFNa.

La Figura 6 muestra el efecto de diversas diluciones de proteínas de fusión de IFNa y albúmina sobre la actividad SEAP en las células indicadoras JSRE-SEAP/293F. Se sometió a ensayo una preparación de IFNa fusionado aguas arriba de la albúmina (◆), así como dos preparaciones diferentes de IFNa fusionado aguas abajo de la albúmina (●) y (■).

La Figura 7 muestra el efecto del tiempo y la dosis de la proteína de fusión de IFNa y albúmina codificada por el ADN comprendido en el constructo 2249 (proteína CID 2249) sobre el nivel de ARNm de OAS (p41) en monos tratados (véase el Ejemplo 78). Por punto horario: primera barra = Control con vehículo, 2ª barra = 30 µg/kg de proteína CID 2249 día I iv, tercera barra = 30 µg/kg de proteína CID 2249 día I sc, 4ª barra = 300 µg/kg de proteína CID 2249 día I sc, 5ª barra = 40 µg/kg de IFNa recombinante día 1, 3 y 5 sc.

La Figura 8 muestra la relación dosis-respuesta de las proteínas de fusión de BNP y albúmina codificadas por ADN comprendido en los constructos CID 3691 y 3618 (proteína CID 3691 y 3618) sobre la activación de la formación de cGMP en células indicadoras NPR-A/293F (véanse los Ejemplos 80 y 81). Se sometieron a ensayo tanto BNP recombinante (■), como, dos preparaciones diferentes de BNP utilizadas aguas arriba de la albúmina (□) y (●).

La Figura 9 muestra el efecto de la proteína de fusión de BNP y albúmina sobre la presión arterial media en ratas espontáneamente hipertensas (véase el Ejemplo 80). Se suministraron vehículo (□), proteínas BNP recombinante (●), o proteína de fusión de BNP y albúmina (○) a través de inyección en la vena de la cola. Se registraron las presiones sanguíneas sistólica y diastólica por el método del manguito en la cola.

La Figura 10 muestra los niveles de GMPc en plasma en ratones C57/BL6 macho de 11 a 12 semanas de edad después de la inyección intravenosa de proteína BNP recombinante (◆) o proteína de fusión de BNP y albúmina (○) (véase el Ejemplo 80). Los niveles de GMPc se determinaron a partir de plasma preparado de tomas de muestras de sangre de la cola en diferentes momentos puntuales después de la inyección intravenosa.

La Figura 11 muestra los niveles de glucosa en sangre en ratones db/db diabéticos de 8 semanas de edad mantenidos en ayunas 24 horas después de la administración individual de fusión de GLP-1(7-36A8G)2x-HSA en tándem (CID 3610) (○), fusión de GLP-1(7-36A8G)-HSA monomérico (Δ), o HSA sola (●). Los niveles de glucosa en sangre se midieron mediante un ensayo de tolerancia a la glucosa oral. La fusión de GLP-1(7-36A8G)2x-HSA en tándem (CID 3610) (○) tuvo una actividad normalizadora de la glucosa inesperada más potente que la fusión de GLP-1(7-36A8G)-HSA monomérica (Δ) 24 horas después de la administración individual a ratones db/db diabéticos de 8 semanas de edad mantenidos en ayunas.

Descripción detallada

Definiciones

Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos utilizados a lo largo de toda esta memoria descriptiva.

Según se utiliza en la presente memoria, "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende, o alternatively consiste en, al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o una variante de la misma) unida en marco a al menos una Proteína terapéutica X (o fragmento o variante de la misma); una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende, o alternatively consiste en, la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: Y (como se describe en la columna 6 de la Tabla 2) o un fragmento o una variante de la misma; una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende o alternatively consiste en la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: X; una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende, o alternatively consiste en, la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: Z; una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención generada como se describe en la Tabla 2 o en los Ejemplos; una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de albúmina Terapéutica de la invención, una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos contenida en un constructo de fusión de albúmina descrito en la Tabla 2, o una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos contenida en un constructo de fusión de albúmina depositado en la ATCC (como se describe en la Tabla 3).

Según se utiliza en la presente memoria, "constructo de fusión de albúmina" se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende, o alternatively consiste en, un polinucleótido que codifica al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o una variante de la misma) unida en marco a al menos un polinucleótido que codifica al menos una molécula de una proteína Terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma); una molécula de ácido nucleico que comprende, o alternatively consiste en, un polinucleótido que codifica al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o una variante de la misma) unida en marco a al menos un polinucleótido que codifica al menos una molécula de una proteína terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma) generada como se

describe en la Tabla 2 o en los Ejemplos; o una molécula de ácido nucleico que comprende, o alternativamente consiste en, un polinucleótido que codifica al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o una variante de la misma) unida en marco a al menos un polinucleótido que codifica al menos una molécula de una proteína terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma), que comprende adicionalmente, por ejemplo, uno o más de los siguientes elementos: (1) un vector auto-replicante funcional (incluyendo pero no limitado a, un vector lanzadera, un vector de expresión, un vector de integración, y/o un sistema de replicación), (2) una región para el inicio de la transcripción (p. ej., una región promotora, tal como por ejemplo, un promotor regulable o inducible, un promotor constitutivo), (3) una región para la terminación de la transcripción, (4) una secuencia líder, y (5) un marcador seleccionable. El polinucleótido que codifica la proteína Terapéutica y la proteína de albúmina, una parte del constructo de fusión de albúmina, pueden ser referidos cada uno como "porción," "región" o "radical" del constructo de fusión de albúmina.

La presente invención se refiere en general a polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina; proteínas de fusión de albúmina; y describe métodos de tratamiento, prevención, o alivio de enfermedades o trastornos utilizando proteínas de fusión de albúmina o polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina. Según se utiliza en la presente memoria, "proteína de fusión de albúmina" se refiere a una proteína formada por la fusión de al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o una variante de la misma) con al menos una molécula de una proteína Terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma). Una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende dos o más polipéptidos de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1) orientados en tándem en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387; (b) una variante de (a) que es idéntica al menos en 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1 y una albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1: o una variante de albúmina cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en donde la proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia líder HAS/KEX 2 modificada del SEQ ID NO: 112, que están asociados entre sí por medio de fusión genética (es decir, la proteína de fusión de albúmina es generada por traducción de un ácido nucleico en el que un polinucleótido que codifica toda o una parte de una proteína Terapéutica está unido en marco a un polinucleótido que codifica toda o parte de la albúmina). La proteína Terapéutica y la proteína de albúmina, que forman una parte de la proteína de fusión de albúmina, pueden ser referidas cada una como "porción," "región" o "radical" de la proteína de fusión de albúmina (p. ej., una "porción de una proteína Terapéutica" o una "porción de una proteína de albúmina"). En una realización muy preferida, una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos una molécula de dos o más polipéptidos de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1) orientados en tándem en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387; (b) una variante de (a) que es idéntica al menos en 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1 y al menos una molécula de albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1: o una variante de albúmina cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en donde la proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia líder HAS/KEX 2 modificada del SEQ ID NO: 112.

En una realización preferida adicional, una proteína de fusión de albúmina de la invención es procesada por una célula anfitriona y secretada al medio de cultivo circundante. El procesamiento de la proteína de fusión de albúmina naciente que se produce en las rutas secretoras del anfitrión utilizado para la expresión puede incluir, pero no se limita a, la escisión del péptido señal; la formación de enlaces disulfuro; el plegamiento apropiado; la adición y procesamiento de carbohidratos (tal como por ejemplo, glicosilación unida a N- y O-); las escisiones proteolíticas específicas; y el ensamblaje en proteínas multiméricas. Una proteína de fusión de albúmina de la invención se encuentra preferiblemente en la forma procesada. La "forma procesada de una proteína de fusión de albúmina" se refiere a una proteína de fusión de albúmina producto que ha experimentado escisión del péptido señal N- terminal, también referido en la presente memoria como "proteína de fusión de albúmina madura".

En varios casos, se depositó un clon representativo que contenía un constructo de fusión de albúmina de la invención en la Colección de Cultivos Tipo Americana (referida en la presente memoria como "ATCC®"). Además, es posible recuperar un constructo de fusión de albúmina dado del depósito por medio de mecanismos conocidos en la técnica y descritos en alguna parte en la presente memoria. La ATCC® está localizada en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA. Los depósitos de la ATCC® se realizaron de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patentes.

En una realización, la invención proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina que comprende, dos o más polipéptidos de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1) orientados en tándem en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387; (b) una variante de (a) que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1 y una albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1: o una variante de albúmina cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en donde la proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia líder

HAS/KEX 2 modificada del SEQ ID NO: 112. En una realización adicional, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende dos o más polipéptidos del péptido 1 de tipo glucagón (GLP1) orientados en tándem en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387; (b) una variante de (a) que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1, y una albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1: o una variante de albúmina cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en donde la proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia líder HAS/KEX 2 modificada del SEQ ID NO: 112. Asimismo se describe un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina cuya secuencia se muestra como SEQ ID NO: Y en la Tabla 2. En realizaciones preferidas, el componente de proteína de albúmina del suero de la proteína de fusión de albúmina es la porción madura de la albúmina de suero. La invención abarca adicionalmente polinucleótidos que codifican estas proteínas de fusión de albúmina.

En realizaciones adicionales, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o alternativamente consiste en, dos o más polipéptidos de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1) orientados en tándem en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387; (b) una variante de (a) que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1, y un fragmento biológicamente activo y/o terapéuticamente activo de albúmina de suero. En realizaciones adicionales, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o alternativamente consiste en, dos o más polipéptidos de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1) orientados en tándem en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387; (b) una variante de (a) que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1 y una variante biológicamente activa y/o terapéuticamente activa de albúmina de suero. En realizaciones preferidas, la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina es la porción madura de la proteína Terapéutica. En una realización preferida adicional, la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina es el dominio soluble extracelular de la proteína Terapéutica. En una realización alternativa, la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina es la forma activa de la proteína Terapéutica. La invención abarca adicionalmente polinucleótidos que codifican estas proteínas de fusión de albúmina.

Proteínas terapéuticas

Como se ha establecido anteriormente, un polinucleótido de la invención codifica una proteína que comprende dos o más polipéptidos de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1) orientados en tándem en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387; (b) una variante de (a) que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1 y una albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1: o una variante de albúmina cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en donde la proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia líder HAS/KEX 2 modificada del SEQ ID NO: 112, que están asociados entre sí, preferiblemente por medio de fusión genética.

Una realización adicional incluye un polinucleótido que codifica una proteína que comprende dos o más polipéptidos de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1) orientados en tándem en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387; (b) una variante de (a) que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1 y una albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1: o una variante de albúmina cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en donde la proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia líder HAS/KEX 2 modificada del SEQ ID NO: 112, que están unidos entre sí mediante conjugación química.

Según se utiliza en la presente memoria, "proteína Terapéutica" se refiere a proteínas, polipéptidos, anticuerpos, péptidos o fragmentos o variantes de los mismos, que tienen una o más actividades terapéuticas y/o biológicas. Las proteínas terapéuticas descritas en la presente memoria incluyen, proteínas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos, y agentes biológicos. Los términos péptidos, proteínas, y polipéptidos se utilizan indistintamente en la presente memoria). Se contempla específicamente que el término "proteína Terapéutica" abarque anticuerpos y fragmentos y variantes de los mismos. De este modo una proteína descrita en la presente memoria puede contener al menos un fragmento o variante de una proteína Terapéutica, y/o al menos un fragmento o variante de un anticuerpo. Adicionalmente, el término "proteína Terapéutica" puede hacer referencia a un correlato, endógeno o de origen natural, de una proteína Terapéutica.

Por polipéptido que presenta una "actividad terapéutica" o proteína que es "terapéuticamente activa" se quiere significar un polipéptido que posee una o más actividades biológicas y/o terapéuticas conocidas asociadas con una

proteína terapéutica tal como una o más de las proteínas Terapéuticas descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica. Como ejemplo no limitante, una "proteína Terapéutica" es una proteína que es útil para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, afección o trastorno. Como ejemplo no limitante, una "proteína Terapéutica" puede ser una que se une específicamente a un tipo de célula concreto (normal (p. ej., linfocitos) o anormal p. ej., (células cancerosas)) y por lo tanto se puede utilizar para dirigir un compuesto (fármaco, o agente citotóxico) a ese tipo de célula específicamente.

Por ejemplo, una lista no exhaustiva de porciones de "proteínas Terapéuticas" que pueden estar incluidas en una proteína de fusión de albúmina descrita en la presente memoria incluye, pero no se limita a, GLP-1, GLP-2, PACAP-27, PACAP-28, VIP, CD4M33, secretina, glicentina, oxintomodulina, PHM, *IFN* α , *IFN* β , ANP, BNP, NGF, BDNF, GDNF, y somatostatina.

También se pueden fusionar híbridos de interferón al extremo amino o carboxi de la albúmina para formar una proteína de fusión de albúmina híbrida de interferón. La proteína de fusión de albúmina híbrida de interferón puede tener una actividad de interferón potenciada, o alternatively, suprimida, tal como la respuesta antiviral, la regulación del crecimiento celular, y la modulación de la respuesta inmunitaria (Lebleu et al., PNAS USA, 73:3107-3111 (1976); Gresser et al., Nature, 251:543-545 (1974); y Johnson, Texas Reports Biol Med, 35:357-369 (1977)). Cada proteína de fusión de albúmina híbrida de interferón se puede utilizar para tratar, prevenir, o aliviar infecciones virales (p. ej., hepatitis (p. ej., VHC); o VIH), esclerosis múltiple o cáncer.

En otro ejemplo no limitante, la "proteína Terapéutica" es una proteína GLP-1 que tiene una actividad biológica, y en particular, una actividad biológica que es útil para el tratamiento, la prevención o el alivio de una enfermedad. Una lista no inclusiva de actividades biológicas que pueden ser poseídas por la proteína Terapéutica incluye, estimulación de la secreción de insulina, supresión del apetito, o una o más cualesquiera de las actividades biológicas descritas en la sección "Actividades Biológicas" de más abajo y/o como se describe para una proteína Terapéutica dada en la Tabla 1 (columna 2).

En una realización, se utilizan fusiones de GLP-1-HSA para regular los niveles de glucosa en pacientes diabéticos. En una realización adicional, se utilizan fusiones en tándem de GLP-1 de tipo salvaje o mutante para regular los niveles de glucosa en sangre en pacientes diabéticos. Por ejemplo, la capacidad de las fusiones de monómero de GLP-1(7-36A8G)-HSA y GLP-1(7-36A8G)-HSA (CID 3610) en tándem para regular los niveles de glucosa en sangre se evaluaron utilizando un ensayo de tolerancia a la glucosa oral (1 gramo de glucosa/kg por gavaje oral), después de la inyección subcutánea de proteína GLP-1-HSA en ratones db/db diabéticos de 8 semanas de edad. Este ensayo de tolerancia a la glucosa consistió en la inyección subcutánea de una fusión de GLP-1-HSA seguido de la administración de 1 gramo de glucosa/kg por gavaje oral. A los ratones db/db diabéticos mantenidos en ayunas se les administraron dosis equimolares (100 y 171 nmoles/kg) de proteína de fusión de GLP-1-HSA en monómero o en tándem y los ensayos de tolerancia a la glucosa oral se realizaron 6 o 24 horas después de una sola administración. Bastante sorprendente e inesperadamente, la fusión GLP-1(7-36A8G)-HSA en tándem (CID 3610) redujo significativamente la glucosa en sangre a las 6 horas de la inyección cuando se comparó con la fusión GLP-1(7-36A8G)-HSA en monómero. Además, la diferencia entre las fusiones GLP-1(7-36A8G)-HSA en monómero y GLP-1(7-36A8G)-HSA en tándem (CID 3610) fue incluso más drástica cuando se evaluaron los ratones db/db diabéticos 24 horas después de la inyección. Como se muestra en la Figura II, la fusión GLP-1(7-36A8G)-HSA en tándem (CID 3610) (0) poseía una actividad normalizadora de la glucosa inesperadamente potente mientras los niveles de glucosa en sangre en ayunas para la fusión GLP-1(7-36A8G)-HAS (Δ) individual fue similar a la de los animales a los que se había administrado HSA sola ($\bullet$) y eran claramente diabéticos por naturaleza.

Según se utiliza en la presente memoria, "actividad terapéutica" o "actividad" puede hacer referencia a una actividad cuyo efecto es compatible con un resultado terapéutico deseable en seres humanos, o a los efectos deseados en mamíferos no humanos o en otras especies u organismos. La actividad terapéutica se puede medir *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, un efecto deseable puede ser analizado en cultivo celular. Tales análisis *in vitro* o cultivo celular se encuentran comúnmente disponibles para muchas proteínas Terapéuticas descritas en la técnica. Los ejemplos de los análisis incluyen, pero no se limitan a aquellos descritos en la presente memoria en la sección Ejemplos o en la columna "Análisis de la Actividad Ilustrativa" (columna 3) de la Tabla 1.

Las proteínas Terapéuticas correspondientes a la porción de la proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, tal como la superficie celular y las proteínas secretoras, a menudo están modificadas por el anclaje de uno o más grupos de oligosacáridos. La modificación, referida como glicosilación, puede afectar drásticamente a las propiedades físicas de las proteínas y puede ser importante en la estabilidad, la secreción, y la localización de la proteína. La glicosilación se produce en localizaciones específicas a lo largo de la cadena principal polipeptídica. Existen normalmente dos tipos principales de glicosilación: la glicosilación caracterizada por oligosacáridos conectados a O, que están anclados a residuos de serina o treonina; y la glicosilación caracterizada por oligosacáridos conectados a N, que están anclados a residuos de asparagina en una secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. El ácido N-acetilneurámico (también conocido como ácido siálico) es normalmente el residuo terminal de los oligosacáridos tanto unidos a N como unidos a O. Las variables tales como la estructura de la proteína y el tipo de célula influyen en el número y la naturaleza de las unidades de carbohidrato dentro de las cadenas en diferentes sitios de glicosilación. Los isómeros de glicosilación también son comunes en el mismo sitio dentro de un tipo de célula dado.

Las proteínas Terapéuticas correspondientes a la porción de la proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, así como los análogos y las variantes de las mismas, se pueden modificar de manera que la glicosilación en uno o más sitios resulta alterada como resultado de la manipulación de su secuencia de ácido nucleico, por la célula anfitriona en la cual son expresadas, o debido a otras condiciones de su expresión. Por ejemplo, los isómeros de glicosilación pueden ser producidos anulando o introduciendo sitios de glicosilación, p. ej., mediante sustitución o delección de residuos de aminoácidos, tales como la sustitución de glutamina por asparragina, o se pueden producir proteínas recombinantes no glicosiladas mediante la expresión de las proteínas en células anfitrionas que no las glicosilarán, p. ej., en *E. coli* o levadura de glicosilación deficiente. Estos enfoques se describen con más detalle más abajo y son conocidos en la técnica.

Las proteínas terapéuticas, descritas en la Tabla 1, y sus secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos son bien conocidas en la técnica y se encuentran disponibles en las bases de datos públicas tales como Chemical Abstracts Services Databases (p. ej., CAS Registry), GenBank, y bases de datos proporcionadas por suscripción tales como GenSeq (p. ej., Derwent). Las secuencias de nucleótidos ilustrativas de proteínas Terapéuticas que se pueden utilizar para obtener un polinucleótido de la invención se muestran en la columna 7, "SEQ ID NO: X," de la Tabla 2. Las secuencias mostradas como SEQ ID NO: X pueden ser una secuencia de polinucleótidos de tipo salvaje que codifica una proteína Terapéutica dada (p. ej., completa o madura), o en algunos casos la secuencia puede ser una variante de dicha secuencia de polinucleótidos de tipo salvaje (p. ej., un polinucleótido que codifica la proteína Terapéutica de tipo salvaje, en donde la secuencia de ADN de dicho polinucleótido ha sido optimizada, por ejemplo, para su expresión en una especie concreta; o un polinucleótido que codifica una variante de la proteína Terapéutica de tipo salvaje (es decir, un mutante dirigido al sitio; una variante alélica)). Está en el conocimiento práctico de los expertos en la técnica el uso de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: X para obtener el constructo descrito en la misma fila. Por ejemplo, si el SEQ ID NO: X corresponde a una proteína completa, pero solamente se utiliza una porción de esa proteína para generar el CID específico, está en el conocimiento práctico del experto en la técnica contar con las técnicas de la biología molecular, tales como la PCR, para amplificar el fragmento específico y clonarlo en el vector apropiado.

La Tabla 1 proporciona la porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido de la invención. La primera columna, "Proteína Terapéutica X," describe la molécula de proteína Terapéutica que puede estar seguida de paréntesis que contienen los nombres científicos y las marcas de las proteínas que comprenden, o alternatively consisten en, esa molécula de proteína Terapéutica o un fragmento o variante de la misma. La "proteína Terapéutica X" según se utiliza en la presente memoria puede hacer referencia a una molécula de proteína Terapéutica individual, o al grupo completo de proteínas Terapéuticas asociadas con una molécula de proteína Terapéutica dada descrita en esta columna. La columna de "Actividad biológica" (columna 2) describe Actividades biológicas asociadas con la molécula de proteína Terapéutica. La Columna 3, "Análisis de la Actividad Ilustrativa", proporciona referencias que describen análisis que se pueden utilizar para someter a ensayo la actividad terapéutica y/o biológica de una proteína Terapéutica: X o una proteína de fusión de albúmina que comprende una porción de proteína Terapéutica X (o un fragmento de la misma). La cuarta columna, "Indicación preferida: Y", describe las enfermedades, los trastornos, y/o las afecciones que pueden ser tratadas, prevenidas, diagnosticadas, y/o aliviadas por la proteína Terapéutica X o una proteína de fusión de albúmina que comprende la porción de proteína Terapéutica X (o un fragmento de la misma). La columna "ID de constructo" (columna 5) proporciona una conexión con un constructo de fusión de albúmina ilustrativo descrito en la Tabla 2 que codifica una proteína de fusión de albúmina que comprende, o alternatively consiste en la porción de Proteína Terapéutica X referenciada (o fragmento de la misma).

Tabla 1

Péptido 1 de Tipo Glucagón (GLP1; GLP-1; Insulinotropina)	Estimula la síntesis y la liberación de insulina; potencia la sensibilidad de tejidos adiposo, muscular, y hepático hacia la insulina; estimula la absorción de glucosa; ralentiza el proceso digestivo; suprime el apetito; bloquea la secreción de glucagón.	La actividad GLP1 se puede analizar in vitro utilizando un análisis de absorción de [3-H]-glucosa. (J Biol Chem 22 Oct. 1999; 274(43):30864-30873). Los efectos de GLP-1 sobre el aprendizaje se pueden investigar utilizando los paradigmas de evitación pasiva y el laberinto de agua de Morris (MWM) en ratas (Brain Res. 1996, 716:29-38 y Nature 1982,297:681-683).	Hiperglicemia; Diabetes; Diabetes Insípida; Diabetes mellitus; Diabetes de tipo 1; Diabetes de tipo 2; Resistencia a la insulina; Deficiencia de insulina; Hiperlipidemia; Hipercetonemia; Diabetes Mellitus no dependiente de insulina (DMNDI); Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID); Una afección asociada a la diabetes incluyendo, pero no limitada a Obesidad, Enfermedad Cardíaca, Hiperglicemia, Infecciones, Retinopatía, y/o Úlcera; Trastornos metabólicos; Trastornos Inmunitarios; Obesidad; Trastornos Vasculares; Supresión de peso corporal; Supresión del apetito; Síndrome X; Deterioro Cognitivo; Pérdida de memoria. Uso para potenciar el aprendizaje, la memoria, el aprendizaje asociativo, el aprendizaje espacial, la plasticidad del hipocampo, la cognición, y/o la neuroprotección.	3610, 3696.	Véase la Tabla 2, SEQ ID NO: Z para el constructo concreto.

Tabla 2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
1	3422	pSAC35:APsp.HSA.IFNα	Péptido señal fosfatasa ácida seguido de HSA madura e IFNα.	pSAC35	149	117	181	213	214		Fosfatasa ácida
2	3423	pSAC35:INVsp.HSA.IFNα	Péptido señal invertasa seguido de HSA madura e IFNα.	pSAC35	150	118	182	215	216		Invertasa
3	3424	pSAC35:KTsp.HSA.IFNα	Péptido señal Toxina Asesina seguido de HSA madura e IFNα.	pSAC35	151	119	183	217	218		Toxina Asesina

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ NO:A	ID	SEQ NO:B	ID	Secuencia Líder
4	2249	pSAC35:IFNa2-HSA también denominado: pSAC23:IFNa2-HSA	IFNa2 maduro fusionado aguas arriba de HSA madura y aguas abajo de secuencia líder de HSNkex2.	pSAC35	152	120	184	219		220		HSNkex2
5	2343	pSAC35.INV-IFNA2.HSA	Interferón alfa2 maduro fusionado aguas arriba de HSA madura y aguas abajo de péptido señal invertasa.	pSAC35	153	121	185	221		222		invertasa
6	2366	pSAC35.MAF-IFNa2.HSA	IFNa maduro fusionado aguas arriba de HSA madura y aguas abajo de la secuencia líder del factor alfa de apareamiento de levadura.	pSAC35	154	122	186	223		224		MFa-1
7	2381	pC4:HSA-IFNa2(CJ7-E181)	Aminoácidos CJ7 a E181 de iFNa2 (fragmento mostrado como aminoácidos C1 a E165 del SEQ ID NO:61S) fusionados aguas abajo de HSA.	pC4	155	123	187	225		226		HSA
8	2382	pC4:IFNa2-HSA	IFNa2 fusionado aguas arriba de HSA madura.	pC4	156	124	188	227		228		Líder de IFNa2 nativo
9	2410	pSAC35INV:IFNa-HSA	IFNa2 maduro fusionado aguas abajo del péptido señal de invertasa y aguas arriba de HSA	pSAC35	157	125	189	229		230		invertasa

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			madura.								
10	3165	pSAC35:HSA:IFNa también denominado CID 3165, pSAC35:HSA:INFa	HSA fusionada aguas arriba de IFNa y aguas abajo del líder HSA/kex2.	pSAC35	158	126	190				HSA/kex2
11	1778	pSAC35:IFNbeta.M22-N187:HSA	Residuos M22-N187 de IFNb completo (mostrado como M1 a N166 del SEQ ID NO: 463) fusionados aguas arriba de HSA madura y aguas abajo de la secuencia líder HSA/kex2 .	pSAC35	159	127	191	231	232		HSA/kex2
12	1779	pSAC35:HSA:IFNbeta.M22-N187	Residuos M22-N 187 de IFNb completo (mostrado como M1 a N166 del SEQ ID NO: 464) fusionado aguas abajo de HSA con la secuencia líder HSA/kex2.	pSAC35	160	128	192				HSA/kex2
13	2011	pC4:IFNb-HSA	IFNb completo fusionado aguas arriba de HSA madura.	pC4	161	129	193	233	234		Líder de IFNb nativo
14	2013	pC4:HSA-IFNb.M22-N187	Aminoácidos M22 a N187 de IFNb (fragmento mostrado como aminoácidos M1 a N166 del SEQ ID NO:	pC4	162	130	194				HSA

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			527) fusionados aguas abajo de HSA.								
15	2053	pEE12:IFNb-HSA también denominado pEE12.I:IFNb β -HSA	IFNb completo fusionado aguas arriba de HSA madura.	pEE12.1	163	131	195				Líder de IFN β nativo
16	2054	pEE12:HSA-IFNb	IFNb maduro fusionado aguas abajo de HSA.	pEE12.1	164	132	196				HSA
17	2492	pC4.IFNb(deltaM22).HSA	INFbeta completo mutante fusionado aguas arriba de HSA madura. Primer residuo de IFNbeta maduro, nativo (M22) ha sido suprimido.	pC4	165	133	197				Líder de IFN β nativo
18	2580	pC4.IFNb(deltaM22,C38S).HSA	IFNb fusionado aguas arriba de HSA madura. El IFNb utilizado en esta fusión carece del primer residuo de la forma madura de IFNb, que corresponde a M22 del SEQ ID NO:1687. También el aminoácido 38 del SEQ ID NO: 1687 ha sido mutado de Cys a Ser.	pC4	166	134	198				IFN β Nativo
19	2795	pC4:HSA(A14)-IFNb.M22-N187	La forma madura de IFNb se fusiona al extremo C de HSA, que contiene un péptido	pC4	167	135	199				HSA modificada (A14)

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ NO:A	ID	SEQ NO:B	ID	Secuencia Líder
			señal modificado, diseñado para mejorar el procesamiento y la homogeneidad.									
20	2796	pC4:HSA(S14).IFNb.M22-N 187	La forma madura de IFNb se fusiona al extremo C de HSA, que contiene un péptido señal modificado, diseñado para mejorar el procesamiento y la homogeneidad.	pC4	168	136	200					HSA modificada (S14)
21	2797	pC4:HSA(G 14)-IFNb.M22-N187	La forma madura de IFNb se fusiona al extremo C de HSA, que contiene un péptido señal modificado.	pC4	169	137	201					HSA modificada (G14)
22	2872	pSAC35:HSA.IFNα(C1-Q91)/ E166)	Este constructo contiene una forma híbrida de IFNα e IFNαD fusionada aguas abajo de HSA madura.	pSAC35	170	138	202	235		236		HSA/kex2
23	2873	pSAC35:HSA.IFNα(C1-Q91)/ B(L93-E166)	Este constructo contiene una forma híbrida de IFNα e IFNαB fusionada aguas abajo de HSA madura.	pSAC35	171	139	203	237		238		HSA/kex2
24	2874	psAC35:HSA.IFNα(C1-Q91)/ E166)	Este constructo contiene una forma híbrida de IFNα e IFNαF	pSAC35	172	140	204	239		240		HSA/kex2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ NO:A	ID	SEQ NO:B	ID	Secuencia Líder
			fusionada aguas abajo de HSA madura.									
25	2875	pSAC35:HSA.IFNαA(C1Q-62)/D(Q64-E166)	Este constructo contiene una forma híbrida de IFNαA e IFNαD fusionada aguas abajo de HSA madura.	pSAC35	173	141	205	241		242		HSA/kex2
26	2876	pSAC35:HSA.IFNαA(C1-Q91)/E166); R23K,A113V D(L93-	Este constructo contiene una forma híbrida de IFNαA e IFNαD fusionada aguas abajo de HSA madura.	pSAC35	174	142	206	243		244		HSA/kex2
27	1757	pSAC35:IL2.A21-T153.145C/S.HSA	IL-2 humana madura con una única mutación de aminoácido (C por S en la posición 145) clonada aguas abajo del líder HSA/KEX2 y de HSA madura	pSAC35	175	143	207					HSA/kex2
28	1758	pSAC35:HSA.IL2.A21-T153.145C/S	IL-2 humana madura con una única mutación de aminoácido (C por S en la posición 145) clonada aguas abajo de HSA con la secuencia líder de HSA/kex2.	pSAC35	176	144	208					HSA/kex2
29	1812	pSAC35:IL2.A21-T153.HSA	Aminoácidos A21 a T153 de IL-2 fusionados aguas abajo del líder HSA/kex2 y aguas arriba	pSAC35	177	145	209					HSA/kex2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ NO:A	ID	SEQ NO:B	ID	Secuencia Líder
			de HSA madura.									
30	1813	pSAC35:HSA.IL2.A21-T153	Aminoácidos A21 a T153 de IL-2 fusionados aguas abajo de HSA con la secuencia líder de HSA/kex2.	pSAC35	178	146	210					HSA/kex2
31	1952	pCDNA3.1:IL2.HSA	IL-2 humana completa, que tiene una mutación de Cisteína por Serina en el aminoácido 145, fusionada aguas arriba de HSA madura.	pCDNA3.1	179	147	211					Líder de IL-2 nativa
32	1954	pC4:IL2.HSA	IL-2 humana completa, que tiene una mutación de Cisteína por Serina en el aminoácido 145, fusionada aguas arriba de HSA madura.	pC4	180	148	212					Líder de IL-2 nativa
33	3468	pSAC35:KTsp.HSA.GH	Péptido señal de toxina asesina seguido de HSA madura seguido de hormona del crecimiento.	pSAC35	313	245	381	449		450		PrePro toxina asesina
34	3469	pSAC35:INVsp.HSA.GH	Péptido señal de invertasa seguido de HSA madura seguido de hormona del crecimiento.	pSAC35	314	246	382	451		452		Invertasa

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ NO:A	ID	SEQ NO:B	ID	Secuencia Líder
35	3470	pSAC35:APsp.HSA.GH	Péptido señal de fosfatasa ácida seguido de HSA madura seguido de hormona del crecimiento.	pSAC35	315	247	383	453		454		Fosfatasa ácida
36	3475	pSAC35:G19Rsp.HSA.GH	Secuencia señal HSA:Kex2 modificada: seguida de HSA madura seguida de hormona del crecimiento	pSAC35	316	248	384	455		456		HSA/Kex2 modificado
37	3476	pSAC35:G19Rsp.HSA.IFNa	Secuencia señal HSA/kex2 modificada seguida de HSA madura seguida de TNF-alfa.	pSAC35	317	249	385	457		458		HSA/Kex2 modificado
38	3549	pSAC35:HSA/kex2.BDNFc.HSA	Líder HSA/kex2 seguido de BDNFc maduro (variante de empalme 6) seguido de HSA madura.	pSAC35	318	250	386		Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
39	3610	pSAC35:(HSA/KEX(R19G))SP.G LP-1(7-36A8G)x2.HSA	Líder HSA/kex2 modificado seguido de dímero de glp-1 de codón optimizado de levadura (donde el segundo codón ha sido alterado de manera que la posición de balanceo de cada codón es diferente del primer dímero) fusionado al	pSAC35	319	251	387	459		460		HSA/Kex2 modificado

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			extremo N de HSA.								
40	3690	pC4:MPIFSP.BNP/HSA	Secuencia señal inhibidora del progenitor mieloide (MPIF) seguida de BNP fusionado al extremo N de HSA madura.	pC4	320	252	388	461	462		MPIF-1
41	3691	pC4.SPCON.BNP/HSA	Una secuencia señal consenso seguida de BNP fusionado al extremo N de HSA madura.	pC4	321	253	389	463	464		Consenso
42	3696	pEE12.1:GLP-1 (7-36(A8G)x2). HSA	Secuencia señal del factor 1 inhibidor del progenitor mieloide (MPIF) seguida de dímero glp-1 de codón optimizado de levadura (donde el segundo dímero ha sido alterado de manera que la posición de balanceo de cada codón es diferente del primer dímero) fusionado al extremo N de HSA.	pEE12.1	322	254	390	465	466		MPIF-1
43	3715	pSAC35:BNP29/HSA.S65	Una única copia de BNP humano (aminoácidos 1-29) fusionado al extremo N de HSA (S65-L585), un truncamiento N-	pSAC35	323	255	391	467	468		HSA/Kex2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ NO:A	ID	SEQ NO:B	ID	Secuencia Líder
			terminal de HSA (delta 1-64). Esto es aguas abajo de la secuencia señal HSA/Kex2.									
44	3723	pEE12.1:MPIFSP.BNP/HSA	Secuencia señal del factor 1 inhibidor del progenitor mielóide (MPIF) seguida de BNP fusionado al extremo N de HSA madura.	pEE12.1	324	256	392	Ninguno	Ninguno	Ninguno		MPIF-1
45	3724	pEE12.1:SPCON.BNP/HSA	Una secuencia señal consenso seguida de BNP fusionado al extremo N de HSA madura.	pEE12.1	325	257	393	Ninguno	Ninguno	Ninguno		Consenso
46	3725	pEE12.1:SPCON2.BNP/HSA	Una secuencia señal consenso seguida de BNP fusionado al extremo N de HSA madura.	pEE12.1	326	258	394	Ninguno	Ninguno	Ninguno		Péptido señal consenso núm. 2
47	3736	pC4:SPCON2.BNP/HSA	Una secuencia señal consenso seguida de BNP fusionado al extremo N de HSA madura.	pC4	327	259	395	469	470	471		Péptido señal consenso núm. 2
48	3769	pC4:BNP(R13G)/HSA	Secuencia señal del factor 1 inhibidor del progenitor mielóide (MPIF) seguida de BNP mutante (R13G)	pC4	328	260	396	471	472	472		MPIF-1

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			fusionado al extremo N de HSA madura.								
49	3778	pC4:SPCON.BNP29/HSA.S65	Una única copia de BNP humano (1-29) fusionada al extremo N de HSA (S65-L585), un truncamiento N-terminal de HSA (delta 1-64). Esto está aguas abajo de una secuencia señal consenso.	pC4	329	261	397	473	474		Consenso
50	3783	pC4:SPCON.BNP(R13G)/HSA	Secuencia señal consenso seguida de BNP mutante (R13G) fusionado al extremo N de HSA madura.	pC4	330	262	398	475	476		Consenso
51	3795	pC4:SPCON.BNP(K14G)/HSA	Secuencia señal consenso seguida de BNP mutante (K14G) fusionado al extremo N de HSA madura.	pC4	331	263	399	477	478		Consenso
52	3796	pSAC35:HSA/BNP	Seguido de HSA madura fusionada al extremo N de BNP.	pSAC35	332	264	400	479	480		HSA/Kex2
53	3809	pSAC35:BNP30(GGG)/HSA	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de BNP (aminoácidos 1-30) fusionado a través de glicinas tripartitas al extremo N de HSA	pSAC35	333	265	401	481	482		HSA/Kex2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			madura.								
54	3886	pSAC35:HSA/KEX2.LANP.HSA	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de LANP fusionada al extremo N de HSA madura. LANP corresponde a los aminoácidos 26-55 del SEQ ID NO: 402 (referida en la presente como LANP).	pSAC35	334	266	402	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
55	3887	pSAC35:HSA/KEX2.HSA.LANP	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de LANP madura.	pSAC35	335	267	403	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
56	3888	pSAC35:HSA/KEX2.VDP.HSA	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de VDP fusionada al extremo N de HSA madura. VDP corresponde a los aminoácidos 56-92 del SEQ ID NO: 404 (referida en la presente como VDP).	pSAC35	336	268	404	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
57	3889	pSAC35:HSA/KEX2.HSA.VDP	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de VDP	pSAC35	337	269	405	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			madura.								
58	3890	pSAC35:HSA/KEX2.KUP.HSA	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de KUP fusionada al extremo N de HSA madura. KUP corresponde a los aminoácidos 104-123 del SEQ ID NO: 406 (referida en la presente como KUP).	pSAC35	338	270	406	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
59	3891	pSAC35:HSA/KEX2.HSA.KUP	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de KUP madura.	pSAC35	339	271	407	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
60	3892	pSAC35:HSA/KEX2.CNP.HSA	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de CNP fusionada al extremo N de HSA madura. CNP corresponde a los aminoácidos 105-123 del SEQ ID NO: 408 (referida en la presente como KUP).	pSAC35	340	272	408	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
61	3893	pSAC35:HSA/KEX2.HSA.CNP	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de CNP	pSAC35	341	273	409	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			madura.								
62	3894	pSAC35:HSA/KEX2.DNP.HSA	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de DNP fusionada al extremo N de HSA madura.	pSAC35	342	274	410	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
63	3895	pSAC35:HSA/KEX2.HSA.DNP	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de DNP madura.	pSAC35	343	275	411	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
64	3896	pSAC35:HSA/KEX(R19G)-BNP30(GGG).HSA	Líder HSA/KEX-2 modificado seguido de BNP (aminoácidos 1-30) fusionado a través de conector de glicina tripartito al extremo N de HSA madura.	pSAC35	344	276	412	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2 modificado
65	3897	pEE12:SPCON-BNP(K14G).HSA	Una secuencia señal consenso seguida de BNP mutante (K14G) fusionado al extremo N de HSA madura.	pEE12.1	345	277	413	Ninguno	Ninguno		Consenso
66	3898	pSAC35:HSA/Kex-2-BNP(K14G).HSA	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de BNP mutante (K14G) fusionado al extremo N de HSA madura.	pSAC35	346	278	414	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
67	3899	pSAC35:HSA/Kex-2(R BNP(K14G).HSA 19G)-	Secuencia señal HSA/KEX-2 modificada seguida de BNP mutante (K14G) fusionado al extremo N de HSA madura.	pSAC35	347	279	415	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2 modificada
68	3900	pSAC35:HSA/Kex-2-HSA.BNP(K14G)	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de BNP mutante (K14G).	pSAC35	348	280	416	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
69	3903	pC4:SPCON-Uricasa.HSA	Una secuencia señal consenso seguida de uricasa de rata fusionada al extremo N de HSA madura.	pC4	349	281	417	Ninguno	Ninguno		Consenso
70	3904	pC4:HSA/Kex2-HSA.Uricasa	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de uricasa de rata.	pC4	350	282	418	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
71	3910	pSAC35:HSA/Kex-2-ADI.HSA	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de arginina desiminasa de micoplasma fusionada al extremo N de HSA madura.	pSAC35	351	283	419	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
72	3915	pC4:SPCON-ADI.HSA	Una secuencia señal consenso seguida de arginina desiminasa de	pC4	352	284	420	Ninguno	Ninguno		Consenso

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			micoplasma fusionada al extremo N de HSA madura.								
73	3917	pC4:HSA/Kex-2-HSA.ADI	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de arginina desiminasa de micoplasma.	pC4	353	285	421	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
74	3918	pSAC35:HSA/Kex2-HSA.ADI	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de arginina desiminasa de micoplasma.	pSAC35	354	286	422	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
75	3919	pSAC35:KEX2.TWEAKR.E28-F75.HSA	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de TweakR (aminoácidos 28-75) fusionada al extremo N de HSA madura. TweakR E28-F75 corresponde a los aminoácidos 28-75 del SEQ ID NO: 423 (referido en la presente como TweakR E28-F75).	pSAC35	355	287	423	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
76	3920	pSAC35:HSA/Kex2-GCB.HSA	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de glucocerebrosidasa lisosomal fusionada al	pSAC35	356	288	424	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			extremo N de HSA madura.								
77	3921	pC4:SPCON-GCB.HSA	Una secuencia señal consenso seguida de glucocerebrosidasa lisosomal fusionada al extremo N de HSA madura.	pC4	357	289	425	Ninguno	Ninguno		Consenso
78	3922	pSAC35:HSA/Kex2-HSA.GCB	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de glucocerebrosidasa lisosomal.	pSAC35	358	290	426	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
79	3923	pC4:HSA/Kex2-HSA.GCB	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de glucocerebrosidasa lisosomal.	pC4	359	291	427	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
80	3924	pSAC35:HSA/Kex2-ADM.HSA	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de adrenomedulina fusionada al extremo N de HSA madura.	pSAC35	360	292	428	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
81	3925	pC4:SPCON-ADM.HSA	Una secuencia señal consenso seguida de adrenomedulina fusionada al extremo N	pC4	361	293	429	Ninguno	Ninguno		Consenso

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			de HSA madura.								
82	3926	pSAC35:HSA/Kex2-HSA.ADM	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de adrenomedulina.	pSAC35	362	294	430	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
83	3927	pC4:HSA/Kex2-HSA.ADM	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de adrenomedulina.	pC4	363	295	431	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
84	3928	pc4:HSA.Kiss.E20-Q145	La región Pre-pro de la secuencia señal de HSA seguida de HSA madura fusionada al extremo N de Kiss (aminoácidos 20-145). Kiss E20-Q145 corresponde a los aminoácidos 20-145 del SEQ ID NO: 432 (referido en la presente como Kiss E20-Q145).	pC4	364	296	432	Ninguno	Ninguno		HSA Pre-Pro
85	3929	pSAC35:KEX2.HSA.KISS-1.E20-Q145	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de Kiss (aminoácidos 20-145).	pSAC35	365	297	433	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
86	3930	pSAC35:KEX2.EfrinaB1.K30-D229.HSA	Secuencia señal HSA/KEX-2 seguida de Efrina B1 (aminoácidos	pSAC35	366	298	434	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			30-229) fusionada al extremo N de HSA madura. Efrina B1 K30-D229 corresponde a los aminoácidos 30-229 del SEQ ID NO: 434 (referida en la presente como Efrina B1 K30.D229).								
87	3931	pc4:EfrinaB1.M1-D229.HSA	Efrina B1 (aminoácidos 1-229), incluyendo la secuencia señal de Efrina B1 nativa, fusionada al extremo N de HSA madura.	pC4	367	299	435	Ninguno	Ninguno		Efrina Nativa B1
88	3932	pc4:TWEAKR.M1-F75.HSA	TweakR (aminoácidos 1-75), incluyendo la secuencia señal de TweakR nativa, fusionada al extremo N de HSA madura. TweakR M1-F75 corresponde a los aminoácidos 1-75 del SEQ ID NO: 436 (referida en la presente como TweakR M1-F75).	pC4	368	300	436	Ninguno	Ninguno		TweakR Nativa
89	3933	pc4:B7-H3.M1-E247.HSA	B7-H3 (aminoácidos 1-247), incluyendo la secuencia señal B7-H3 nativa, fusionada al extremo N de HSA	pC4	369	301	437	Ninguno	Ninguno		B7-H3 nativa

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
			madura.								
90	3934	pc4:HSA.EfrinaB1.K30-D229	La región pre-pro de la secuencia señal de HSA seguida de HSA madura fusionada al extremo N de Efrina B1 (aminoácidos 30-229).	pC4	370	302	438	Ninguno	Ninguno		HSA Pre-Pro
91	3935	pSAC35:HSA.EfrinaB1.K30-D229	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de HSA madura fusionada al extremo N de Efrina B1 (aminoácidos 30-229).	pSAC35	371	303	439	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
92	3936	pc4:SPCON.cUricasa.HSA	Una secuencia señal consenso seguida de uricasa de chimpancé fusionada al extremo N de HSA madura.	pC4	372	304	440	Ninguno	Ninguno		Consenso
93	3937	pc4:HSA.cUricasa	La región pre-pro de la secuencia señal de HSA seguida de HSA madura fusionada al extremo N de uricasa de chimpancé.	pC4	373	305	441	Ninguno	Ninguno		HSA Pre-Pro
94	3938	pc4:SPCON.hUricasa.HSA	Una secuencia señal consenso seguida de uricasa fusionada al extremo N de HSA madura.	pC4	374	306	442	Ninguno	Ninguno		Consenso

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	ID	Secuencia Líder
95	3939	pc4:HSA.hUricasa	La región pre-pro de la secuencia señal de HSA seguida de HSA madura fusionada al extremo N de uricasa.	pC4	375	307	443	Ninguno	Ninguno		HSA Pre-Pro
96	3940	pc4:SPCON.bUricasa.HSA	Una secuencia señal consenso seguida de uricasa de babuino fusionada al extremo N de HSA madura.	pC4	376	308	444	Ninguno	Ninguno		Consenso
97	3941	pc4:HSA.bUricasa	La región pre-pro de la secuencia señal de HSA seguida de HSA madura fusionada al extremo N de uricasa de babuino.	pC4	377	309	445	Ninguno	Ninguno		HSA Pre-Pro
98	3942	p5AC35:KEX2.hUricasa.HSA	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de uricasa fusionada al extremo N de HSA madura.	pSAC35	378	310	446	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
99	3943	pSAC35:KEX2.cUricasa.HSA	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de uricasa de chimpancé fusionada al extremo N de HSA madura.	pSAC35	379	311	447	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2
100	3944	pSAC35:KEX2.bUricasa.HSA	Secuencia señal HSA/Kex2 seguida de uricasa de babuino fusionada al extremo N	pSAC35	380	312	448	Ninguno	Ninguno		HSA/Kex2

Fusión Núm.	ID de Constructo	Nombre del Constructo	Descripción	Vector de Expresión	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ NO:A	ID	SEQ NO:B	ID	Secuencia Líder
			de HSA madura.									
101	3618	pC4:SPCON:BNP 1-32(2x)/HSA	Una secuencia señal consenso seguida de dos copias en tándem de BNP maduro fusionado al extremo N de HSA madura.	pC4	483	484	485	463		464		Consenso

- La Tabla 2 proporciona una lista no exhaustiva de polinucleótidos que comprende, o alternatively consiste en, moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión de albúmina. La primera columna, "Fusion Núm." proporciona un número de fusión a cada polinucleótido. La columna 2, "ID de Constructo" proporciona un identificador numérico único para cada polinucleótido de la invención. Los ID de constructo se pueden utilizar para
- 5 identificar polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina que comprenden, o alternatively consisten en, una porción de proteína Terapéutica correspondiente a una Proteína terapéutica: X dada enumerada en la correspondiente fila de la Tabla 1 en donde ese ID de Constructo se enumera en la columna 5. La columna "Nombre del Constructo" (columna 3) proporciona el nombre de un constructo o polinucleótido de fusión de albúmina dado.
- 10 La cuarta columna de la Tabla 2, "Descripción" proporciona una descripción general de un constructo de fusión de albúmina dado, y la quinta columna, "Vector de Expresión" enumera el vector en el que se clonó un polinucleótido que comprende, o alternatively consiste en, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina dada. Los vectores son conocidos en la técnica, y se encuentran disponibles en el mercado o se describen en alguna parte. Por ejemplo, como se describe en los Ejemplos, un "casete de expresión" que
- 15 comprende, o alternatively consiste en, uno o más de (1) un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina dada, (2) una secuencia líder, (3) una región promotora, y (4) un terminador transcripcional, se puede ensamblar en un vector de clonación conveniente y con posterioridad se puede mover a un vector alternativo, tal como, por ejemplo, un vector de expresión que incluye, por ejemplo, un vector de expresión de levadura o un vector de expresión de mamífero. En una realización, para la expresión en *S. cerevisiae*, se clona un casete de expresión que comprende, o alternatively consiste en, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina en pSAC35. En otra realización, para la expresión en células CHO, se clona un casete de expresión que comprende, o alternatively consiste en, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina en pC4. En una realización adicional, se clona un polinucleótido que comprende o alternatively consiste en una molécula de ácido nucleico que codifica la porción de proteína Terapéutica de una proteína de
- 20 fusión de albúmina en pC4:HSA. En otra realización más, para la expresión en células NSO, se clona un casete de expresión que comprende, o alternatively consiste en, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina en pEE12. Otros vectores de clonación y/o expresión útiles serán conocidos para el experto en la técnica y están dentro del alcance de la invención.
- La columna 6, "SEQ ID NO: Y," proporciona la secuencia de aminoácidos completa de la proteína de fusión de albúmina. En la mayoría de los casos, el SEQ ID NO: Y muestra la forma no procesada de la proteína de fusión de albúmina codificada - en otras palabras, el SEQ ID NO: Y muestra la secuencia señal, una porción de HSA, y una porción terapéutica, todas codificadas por el constructo concreto. Específicamente se contemplan todos los polinucleótidos que codifican SEQ ID NO: Y. Cuando estos polinucleótidos se utilizan para expresar la proteína codificada a partir de una célula, las etapas de secreción y procesamiento naturales de la célula producen una
- 30 proteína que carece de la secuencia señal enumerada en las columnas 4 y/u 11 de la Tabla 2. La secuencia de aminoácidos específica de la secuencia señal enumerada se muestra más adelante en la memoria descriptiva o es bien conocida en la técnica. De este modo, incluye la proteína de fusión de albúmina producida por una célula (que carecería de la secuencia líder mostrada en las columnas 4 y/u 11 de la Tabla 2). Asimismo los más preferidos son los polipéptidos que comprenden el SEQ ID NO: Y sin la secuencia líder específica enumerada en las columnas 4 y/u 11 de la Tabla 2. También se prefieren las composiciones que comprenden estas dos realizaciones preferidas, incluyendo las composiciones farmacéuticas. Por otra parte, se encuentra dentro del conocimiento práctico de los expertos en la técnica remplazar la secuencia señal enumerada en las columnas 4 y/u 11 de la Tabla 2 por una secuencia señal diferente, tales como las descritas más adelante en la memoria descriptiva para facilitar la secreción de la proteína de fusión de albúmina procesada.
- 40 La séptima columna, "SEQ ID NO: X", proporciona la secuencia de ácido nucleico parental a partir de la cual se puede obtener un polinucleótido que codifica una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina dada. En una realización, la secuencia de ácido nucleico parental de la cual se puede obtener un polinucleótido que codifica la porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia del gen de tipo salvaje que codifica la proteína Terapéutica mostrada en la Tabla 1. En una realización alternativa, la secuencia de ácido nucleico parental a partir de la cual se puede obtener un polinucleótido que codifica una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina comprende una variante o derivado de una secuencia del gen de tipo salvaje que codifica una proteína Terapéutica mostrada en la Tabla 1, tal como, por ejemplo, una variante de codón optimizado sintética de una secuencia génica de tipo salvaje que codifica una proteína Terapéutica.
- 50 La octava columna, "SEQ ID NO: Z," proporciona una traducción pronosticada de la secuencia de ácido nucleico parental (SEQ ID NO: X). Esta secuencia parental puede ser una proteína parental completa utilizada para obtener el constructo concreto, la porción madura de una proteína parental, una variante o fragmento de una proteína de tipo salvaje, o una secuencia artificial que se puede utilizar para crear el constructo descrito. Un experto en la técnica puede utilizar esta secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: Z para determinar qué residuos de
- 55 aminoácido de una proteína de fusión de albúmina codificada por un constructo dado son proporcionados por la proteína terapéutica. Por otra parte, está dentro del conocimiento práctico del experto en la técnica utilizar la secuencia mostrada como SEQ ID NO: Z para obtener el constructo descrito en la misma fila. Por ejemplo, si el SEQ ID NO: Z corresponde a una proteína completa, pero solamente se utiliza una porción de esa proteína para generar

el CID específico, está dentro del conocimiento práctico de la técnica contar con técnicas de la biología molecular, tales como la PCR, para amplificar el fragmento específico y clonarlo en el vector apropiado.

- 5 Los cebadores de amplificación proporcionados en las columnas 9 y 10, "SEQ ID NO: A" y "SEQ ID NO: B" respectivamente, son cebadores ilustrativos utilizados para generar un polinucleótido que comprende o
- 10 5 alternativamente consiste en una molécula de ácido nucleico que codifica la porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina dada. En una realización de la invención, se utilizan cebadores oligonucleotídicos que tienen las secuencias mostradas en las columnas 9 y/o 10 (SEQ ID NOS: A y/o B) para amplificar por PCR un polinucleótido que codifica la porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina utilizando una molécula de ácido nucleico que comprende o alternativamente consiste en la secuencia de nucleótidos proporcionada en la columna 7 (SEQ ID NO: X) de la fila correspondiente como ADN molde. Los métodos de PCR están bien establecidos en la técnica. Otras secuencias cebadoras útiles podrían ser fácilmente previstas y utilizadas por los expertos normales en la técnica.

En una realización alternativa, se pueden utilizar cebadores oligonucleotídicos en reacciones de PCR solapantes para generar mutaciones en una secuencia de ADN molde. Los métodos de PCR son conocidos en la técnica.

- 15 Como se muestra en la Tabla 3, ciertos constructos de fusión de albúmina descritos en esta solicitud han sido depositados en la ATCC®.

Tabla 3

ID de Constructo	Nombre del Constructo	Núm. de depósito ATCC/ Fecha
1812	pSAC35:1L2.A21-TJ 53.HSA	PTA-3759 4 Oct., 2001
2053	pEE12:IFNb-HSA también denominado pEE12.1 :IFN13-HSA	PTA-3764 4 Oct., 2001
2054	pEE12:HSA-IFNb	PTA-3941 19 Dic., 2001
2249	pSAC35:IFNa2-HSA también denominado pSAC23:IFNa2-HSA	PTA-3763 4 Oct., 2001
2343	pSAC35.1NV-IFNA2.HSA	PTA-3940 19, Dic., 2001
2381	pC4:HSA-IFNa2(C17-E181)	PTA-3942 19 Dic., 2001
2382	pC4:IFNa2-HSA	PTA-3939 19 Dic., 2001
2492	pC4:IFNb(deltaM22).HSA	PTA-3943 19 Dic., 2001
3165	pSAC35:HSA.IFNa también denominado CID 3165, pSAC35:HSA.INFa	PTA-4670 16 Sept., 2002

- 20 Es posible recuperar un constructo de fusión de albúmina dado del depósito mediante mecanismos conocidos en la técnica y descritos en alguna parte en la presente memoria (véase el Ejemplo 10). La ATCC está localizada en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA. Los depósitos de la ATCC se realizaron en conformidad con los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patentes.

- 25 En una realización adicional de la invención, un "casete de expresión" que comprende, o alternativamente consiste en uno o más de (1) un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina dada, (2) una secuencia líder, (3) una región promotora, y (4) un terminador transcripcional se puede mover o "subclonar" de un vector a otro. Los fragmentos que se van a subclonar se pueden generar mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, amplificación por PCR (p. ej., utilizando cebadores oligonucleotídicos que tienen la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: A o B), y/o digestión con enzimas de restricción.

- 30 En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención son capaces de tener actividad terapéutica y/o actividad biológica correspondiente a la actividad terapéutica y/o la actividad biológica de la proteína Terapéutica correspondiente a la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina enumerada en la Tabla 1. En realizaciones adicionalmente preferidas, las porciones de proteína terapéuticamente activa de las

proteínas de fusión de albúmina de la invención son fragmentos o variantes de la proteína codificada por la secuencia mostrada en la columna de SEQ ID NO: X de la Tabla 2, y son capaces de tener actividad terapéutica y/o actividad biológica de la correspondiente proteína Terapéutica.

Fragmentos y variantes de polipéptidos y polinucleótidos

5 Fragmentos

La presente invención está dirigida adicionalmente a fragmentos de la proteína Terapéutica descrita en la Tabla 1, proteínas de albúmina, y/o proteínas de fusión de albúmina de la invención.

La presente invención también está dirigida a polinucleótidos que codifican fragmentos de la proteína Terapéutica descrita en la Tabla 1, proteínas de albúmina, y/o proteínas de fusión de albúmina de la invención.

- 10 Incluso si la delección de uno o más aminoácidos del extremo N de una proteína da como resultado la modificación o pérdida de una o más funciones biológicas de la proteína Terapéutica, la proteína de albúmina, y/o la proteína de fusión de albúmina de la invención, todavía se pueden conservar otras actividades Terapéuticas y/o actividades funcionales (p. ej., actividades biológicas, capacidad para multimerizar, capacidad para unirse a un ligando). Por ejemplo, la capacidad de los polipéptidos con delecciones N-terminales para inducir y/o unirse a anticuerpos que reconocen las formas completas o maduras de los polipéptidos generalmente se conservarán cuando se eliminen menos de la mayoría de los residuos del polipéptido completo del extremo N. Se puede determinar fácilmente por medio de métodos rutinarios descritos en la presente memoria y conocidos de otro modo en la técnica si un polipéptido concreto que carece de residuos N-terminales de un polipéptido completo conserva tales actividades inmunológicas. No es improbable que una mutéina con un número mayor de residuos de aminoácido N-terminales suprimidos pueda conservar ciertas actividades biológicas o inmunogénicas. De hecho, los péptidos compuestos por tan solo seis residuos de aminoácido a menudo pueden provocar una respuesta inmunitaria.

- Por consiguiente, los fragmentos de una proteína Terapéutica correspondiente a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, incluyen la proteína completa así como los polipéptidos que tienen uno o más residuos suprimidos del extremo amino de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia (es decir la proteína Terapéutica referida en la Tabla 1, o una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 2). En particular, las delecciones N-terminales pueden ser descritas por la fórmula general m a q , donde q es un número entero completo que representa el número total de residuos de aminoácido en un polipéptido de referencia (p. ej., la proteína Terapéutica referida en la Tabla 1, o una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 2), y m se define como cualquier número entero que oscila entre 2 y q menos 6. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención.

- Además, los fragmentos de polipéptidos de albúmina de suero correspondientes a una porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención, incluyen la proteína completa así como los polipéptidos que tienen uno o más residuos suprimidos del extremo amino de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia (esto es, albúmina de suero, o una porción de albúmina de suero de una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 2). En realizaciones preferidas, las delecciones N-terminales pueden ser descritas por la fórmula general m a 585, donde 585 es un número entero completo que representa el número total de residuos de aminoácido en la albúmina de suero humana madura (SEQ ID NO: 1), y m se define como cualquier número entero que oscila entre 2 y 579. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención. En realizaciones adicionales, las delecciones N-terminales pueden ser descritas por la fórmula general m a 609, donde 609 es un número entero completo que representa el número total de residuos de aminoácido en la albúmina de suero humana completa (SEQ ID NO: 3), y m se define como cualquier número entero que oscila entre 2 y 603. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención.

- Por otra parte, los fragmentos de proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen proteínas de fusión de albúmina completas así como polipéptidos que tienen uno o más residuos suprimidos del extremo amino de la proteína de fusión de albúmina (p. ej., una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 2; o una proteína de fusión de albúmina que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la columna 6 de la Tabla 2). En particular, las delecciones N-terminales pueden ser descritas por la fórmula general m a q , donde q es un número entero completo que representa el número total de residuos de aminoácido en la proteína de fusión de albúmina, y m se define como cualquier número entero que oscile entre 2 a q menos 6. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención.

Asimismo como se ha mencionado antes, incluso si la delección de uno o más aminoácidos del extremo N o el extremo C de un polipéptido de referencia (p. ej., una proteína Terapéutica; una proteína de albúmina de suero; o una proteína de fusión de albúmina de la invención) da como resultado una modificación o pérdida de una o más

funciones biológicas de la proteína, todavía se pueden conservar otras actividades funcionales (p. ej., actividades biológicas, capacidad para multimerizar, capacidad para unirse a un Ligando) y/o actividades Terapéuticas. Por ejemplo la capacidad de los polipéptidos con delecciones C-terminales para inducir y/o unirse a anticuerpos que reconocen las formas completas o maduras del polipéptido generalmente será conservada cuando se elimine del extremo C menos de la mayoría de los residuos del polipéptido completo o maduro. El que un polipéptido concreto que carece de residuos N-terminales y/o C-terminales de un polipéptido de referencia conserve la actividad Terapéutica puede ser fácilmente determinado mediante métodos rutinarios descritos en la presente memoria y/o conocidos de otro modo en la técnica.

La presente invención proporciona adicionalmente polipéptidos que tienen uno o más residuos suprimidos del extremo carboxi de la secuencia de aminoácidos de una proteína Terapéutica correspondiente a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención (p. ej., una proteína Terapéutica referida en la Tabla 1, o una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descrito en la Tabla 2). En particular, las delecciones C-terminales pueden ser descritas por la fórmula general $1 \text{ a } n$, donde n es cualquier número entero completo que oscila entre 6 a q menos 1, y donde q es un número entero completo que representa el número total de residuos de aminoácido en un polipéptido de referencia (p. ej., una proteína Terapéutica referida en la Tabla 1, o una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 2). Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención.

Además, la presente invención proporciona polipéptidos que tienen uno o más residuos suprimidos del extremo carboxi de la secuencia de aminoácidos de una proteína de albúmina correspondiente a una porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención (p. ej., albúmina de suero o una porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 2). En particular, las delecciones C-terminales pueden ser descritas por la fórmula general $1 \text{ a } n$, donde n es cualquier número entero completo que oscila entre 6 y 584, donde 584 es el número entero completo que representa el número total de residuos de aminoácido en la albúmina de suero humana madura (SEQ ID NO: 1) menos 1. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención. En particular, las delecciones C-terminales pueden ser descritas por la fórmula general $1 \text{ a } n$, donde n es cualquier número entero completo que oscila entre 6 y 608, donde 608 es el número entero completo que representa el número total de residuos de aminoácido en la albúmina de suero (SEQ ID NO:3) menos 1. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención.

Por otra parte, la presente invención proporciona polipéptidos que tienen uno o más residuos suprimidos del extremo carboxi de una proteína de fusión de albúmina de la invención. En particular, las delecciones C-terminales se pueden describir mediante la fórmula general $1 \text{ a } n$, donde n es cualquier número entero completo que oscila entre 6 y q menos 1, y donde q es un número entero completo que representa el número total de residuos de aminoácido de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención.

Además, cualquiera de las delecciones N o C-terminales descritas anteriormente puede ser combinada para producir un polipéptido de referencia con supresiones N y C-terminales. La invención también proporciona polipéptidos que tienen uno o más aminoácidos suprimidos a partir de los extremos amino y carboxilo, que pueden ser descritos generalmente por tener residuos $m \text{ a } n$ de un polipéptido de referencia (p. ej., la proteína Terapéutica referida en la Tabla 1, o una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de proteína Terapéutica codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 2, o albúmina de suero (p. ej., SEQ ID NO: 1), o una porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de proteína de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 2, o una proteína de fusión de albúmina, o una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina de la invención) donde n y m son números enteros como se ha descrito anteriormente. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención.

La presente solicitud también está dirigida a proteínas que contienen polipéptidos idénticos en al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a una secuencia polipeptídica de referencia (p. ej., la proteína Terapéutica referida en la Tabla 1, o una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de proteína Terapéutica codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 2, o albúmina de suero (p. ej., SEQ ID NO: 1), o una porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de proteína de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 2, o una proteína de fusión de albúmina, o una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina de la invención) mostrados en la presente memoria, o fragmentos de los mismos. En realizaciones preferidas, la solicitud está dirigida a proteínas que comprenden polipéptidos idénticos en al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a polipéptidos de referencia que tienen la secuencia de aminoácidos con las delecciones N y C-terminales descritas anteriormente. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención.

Los fragmentos de polipéptidos preferidos de la invención son fragmentos que comprenden, o alternativamente, consisten en, una secuencia de aminoácidos que presenta una actividad Terapéutica y/o actividad funcional (p. ej., actividad biológica) de la secuencia de polipéptido de la proteína Terapéutica o proteína de albúmina de suero cuya secuencia de aminoácidos es un fragmento.

- 5 Otros fragmentos de polipéptido preferidos son los fragmentos biológicamente activos. Los fragmentos biológicamente activos son aquellos que muestran actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad del polipéptido de la presente invención. La actividad biológica de los fragmentos puede incluir una mejor de la actividad deseada, o una disminución de la actividad no deseable.

Variantes

- 10 "Variante" se refiere a un polinucleótido o ácido nucleico que difieren de un ácido nucleico o polipéptido de referencia, pero que conservan las propiedades esenciales de los mismos. Generalmente, las variantes son sobre todo muy similares, y, en muchas regiones, idénticas al ácido nucleico o polipéptido de referencia.

Según se utiliza en la presente memoria, "variante", se refiere a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, una porción de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una proteína de fusión de albúmina de la invención que tiene una secuencia diferente a la de una proteína Terapéutica (p. ej., véase la columna "Proteína Terapéutica" de la Tabla 1), una proteína de albúmina, y/o una proteína de fusión de albúmina, respectivamente, pero que conservan al menos una propiedad funcional y/o terapéutica de las mismas como se describe en algún lugar en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica. Generalmente, las variantes son sobre todo muy similares, y, en muchas regiones, idénticas a la secuencia de aminoácidos de la proteína Terapéutica correspondiente a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina, proteína de albúmina que corresponde a una porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina, y/o proteína de fusión de albúmina. Los ácidos nucleicos que codifican estas variantes también están incluidos en la invención.

La presente invención también está dirigida a proteínas que comprende, o alternativamente consisten en, una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, por ejemplo, a la secuencia de aminoácidos de la proteína Terapéutica correspondiente a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención (p. ej., la secuencia de aminoácidos de la proteína Terapéutica: X descrita en la Tabla 1; o la secuencia de aminoácidos de una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en las Tablas 1 y 2, o fragmentos o variantes de los mismos), proteínas de albúmina correspondientes a una porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención (p. ej., la secuencia de aminoácidos de una porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descritos en la Tabla 1 y 2; la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1; o fragmentos o variantes de la misma), y/o proteínas de fusión de albúmina. También se proporcionan los fragmentos de estos polipéptidos (p. ej., aquellos fragmentos descritos en la presente memoria). Otros polipéptidos incluidos en la invención son los polipéptidos codificados por polinucleótidos que hibridan con el complemento de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención en condiciones de hibridación rigurosas (p. ej., hibridación a ADN unido a un filtro en 6X Cloruro de sodio/Citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 grados Celsius, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a aproximadamente 50 - 65 grados Celsius), en condiciones muy rigurosas (p. ej., hibridación a ADN unido a un filtro en 6X cloruro de sodio/Citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 grados Celsius, seguido de uno o más lavados en 0,1X SSC, SDS al 0,2% a aproximadamente 68 grados Celsius), o en otras condiciones de hibridación rigurosas que son conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., eds., 1989 Current Protocol in Molecular Biology. Green publishing associates, Inc., y John Wiley & Sons Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1 - 6.3.6 y 2.10.3). Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención.

Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos "idéntica" en al menos, por ejemplo, 95% a una secuencia de aminoácidos problema, se quiere significar que la secuencia de aminoácidos del polipéptido sujeto es idéntica a la secuencia problema excepto que la secuencia del polipéptido sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos problema. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 95% a una secuencia de aminoácidos problema, se puede insertar, suprimir, o sustituir por otro aminoácido hasta 5% de los residuos de aminoácido de la secuencia sujeto. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en otra parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Como cuestión práctica, se puede determinar si cualquier polipéptido concreto es idéntico en al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, por ejemplo, a la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de albúmina de la invención o un fragmento de la misma (tal como una porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina o una porción de albúmina de la proteína de fusión de albúmina), convencionalmente

utilizando programas de ordenador conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia problema (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también referida como alineamiento de secuencias global, se puede determinar utilizando el programa de ordenador FASTDB basándose en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)). En un alineamiento de secuencias, las secuencias problema y sujeto son o bien ambas secuencias de nucleótidos o bien ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento de secuencias global se expresa como porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos utilizados en un alineamiento de aminoácidos FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tuplo=2, Penalización por emparejamiento erróneo=1, Penalización por Unión=20, Aleatorización de la Longitud del Grupo=0, Puntuación de Corte=1, Tamaño de la Ventana=longitud de la secuencia, Penalización por Espacio=5, Penalización por Tamaño del Espacio=0,05, Tamaño de la Ventana=500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos sujeto, lo que sea más corto.

Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia problema debido a delecciones N o C-terminales, no debido a delecciones internas, se debe realizar una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no considera los truncamientos N y C-terminales de la secuencia sujeto cuando calcula el porcentaje de identidad global. Para las secuencias sujeto truncadas en los extremos N y C, con respecto a la secuencia problema, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de residuos de la secuencia problema que son N y C-terminales de la secuencia sujeto, que no están emparejados/alineados con un residuo sujeto correspondiente, como porcentaje de las bases totales de la secuencia problema. El que un residuo esté emparejado/alineado se determina por los resultados del alineamiento de secuencias FASTDB. Este porcentaje se resta a continuación del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación de porcentaje de identidad final es la que se utiliza para los fines de la presente invención. Solamente los residuos de los extremos N y C de la secuencia sujeto, que no están emparejados/alineados con la secuencia problema, son tenidos en cuenta para los fines del ajuste manual de la puntuación del porcentaje de identidad. Esto es, solamente las posiciones de los residuos problema fuera de los residuos N y C-terminales más lejanos de la secuencia sujeto.

Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 residuos de aminoácido se alinea con una secuencia problema de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La delección se produce en el extremo N de la secuencia sujeto y por lo tanto, el alineamiento FASTDB no muestra un emparejamiento/alineamiento de los 10 primeros residuos en el extremo N. Los 10 residuos no emparejados representan 10% de la secuencia (número de residuos en los extremos N y C no emparejados/número total de residuos en la secuencia problema) de manera que el 10% se resta de la puntuación de porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes estuvieran perfectamente emparejados, el porcentaje de identidad final sería de 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia sujeto de 90 residuos con una secuencia problema de 100 residuos. Esta vez las delecciones son delecciones internas de manera que no hay residuos en los extremos N o C de la secuencia sujeto que no estén emparejados/alineados con el problema. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por medio de FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solamente las posiciones de los residuos fuera de los extremos N y C-terminales de la secuencia sujeto, presentadas en el alineamiento de FASTDB, que no están emparejadas/alineadas con la secuencia problema se corrigen manualmente. No se realizan otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

La variante tendrá normalmente una identidad de secuencia de al menos 75% (preferiblemente al menos aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99%) con una longitud de HA o proteína Terapéutica normal que tiene la misma longitud que la variante. La homología o identidad a nivel de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos se determina mediante análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizando el algoritmo empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx (Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268 (1990) y Altschul, J. Mol. Evol. 36: 290-300 (1993), incorporados completamente como referencia) que están adaptados para la búsqueda de similitud de secuencia.

El enfoque utilizado por el programa BLAST consiste en considerar primero los segmentos similares entre una secuencia problema y una secuencia de una base de datos, a continuación evaluar la significación estadística de todos los emparejamientos que se identifican y finalmente resumir solamente aquellos emparejamientos que satisfacen un umbral de significación previamente seleccionado. Para una discusión de las cuestiones básicas en la búsqueda de similitud de las bases de datos de secuencias, véase Altschul et al., (Nature Genetics 6: 119-129 (1994)) que se incorpora en su totalidad como referencia. Los parámetros de búsqueda para el histograma, las descripciones, los alineamientos, la esperanza (es decir, el umbral de significación estadística para referir emparejamientos frente a secuencias de bases de datos), el corte, la matriz y el filtro están en los ajustes por defecto. La matriz de puntuación por defecto utilizada por blastp, blastx, tblastn, y tblastx es la matriz BLOSUM62 (Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 (1992), incorporada en su totalidad como referencia). Para blastn, la matriz de puntuación viene fijada por las razones de M (es decir, la puntuación de recompensa para un par de residuos de emparejamiento) con respecto a N (es decir, la puntuación de penalización para los residuos del emparejamiento erróneo), en donde los valores por defecto para M y N son 5 y -4, respectivamente. Cuatro parámetros blastn pueden ser ajustados como sigue: Q=10 (penalización de creación de espacio); R=10 (penalización de extensión de espacio); "wink"=1 (genera coincidencias en cada posición winkth a lo largo del problema); y gapw=16 (ajusta la anchura de la ventana dentro de la cual se generan los alineamientos con espacios). Los ajustes de los parámetros de Blastp equivalentes fueron Q=9; R=2; wink=1; y gapw=32. Una

comparación Bestfit entre secuencias, disponible en la versión del paquete de GCG 10.0, utiliza los parámetros de ADN GAP=50 (penalización por creación de espacio) y LEN=3 (penalización por extensión de espacio) y los ajustes equivalentes en las comparaciones de proteínas son GAP=8 y LEN=2.

Las variantes de polinucleótidos de la invención pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, las regiones no codificantes, o ambas. Son especialmente preferidas las variantes de polinucleótidos que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones, o deleciones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Se prefieren las variantes de nucleótidos producidas por las sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Por otra parte, también se prefieren las variantes de polipéptidos en las que menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10, o 5-50, 5-25, 5-10, 1-5, o 1-2 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos en cualquier combinación. Las variantes de polinucleótidos pueden ser producidas por una variedad de razones, p. ej., para optimizar la expresión de codones para un anfitrión concreto (cambiar codones en el ARNm humano por aquellos preferidos por un anfitrión bacteriano, tal como levadura o *E. coli*).

En una realización preferida, un polinucleótido de la invención que codifica la porción de albúmina de una proteína de fusión de albúmina se optimiza para la expresión en células de levadura o mamífero. En una realización adicionalmente preferida, un polinucleótido de la invención que codifica la porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina se optimiza para la expresión en células de levadura o mamífero. En una realización aún más preferida, un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se optimiza para la expresión en células de levadura o mamífero.

En una realización alternativa, un polinucleótido de codón optimizado que codifica una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina no hibrida con el polinucleótido de tipo salvaje que codifica la proteína Terapéutica en condiciones de hibridación rigurosas como se describe en la presente memoria. En otra realización, un polinucleótido de codón optimizado que codifica una porción de albúmina de una proteína de fusión de albúmina no hibrida con el polinucleótido de tipo salvaje que codifica la proteína de albúmina en condiciones de hibridación rigurosas como se describe en la presente memoria. En otra realización, un polinucleótido de codón optimizado que codifica una proteína de fusión de albúmina no hibrida con el polinucleótido de tipo salvaje que codifica la porción de proteína Terapéutica o la porción de proteína de albúmina en condiciones de hibridación rigurosas como se describe en la presente memoria.

En una realización adicional, un polinucleótido que codifica una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina no comprende, o alternativamente consiste en, la secuencia de origen natural de esa proteína Terapéutica. En una realización adicional, un polinucleótido que codifica una porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina no comprende, o alternativamente consiste en, la secuencia de origen natural de la proteína de albúmina. En una realización alternativa, un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina no comprende, o alternativamente consiste en, la secuencia de origen natural de una porción de proteína Terapéutica o la porción de proteína de albúmina.

Las variantes de origen natural se denominan "variantes alélicas" y hacen referencia a una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo. (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar a nivel de polinucleótido y/o polipéptido y están incluidas en la presente invención. Alternativamente, las variantes de origen no natural pueden ser producidas mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

Utilizando métodos conocidos de diseño de proteínas y tecnología de ADN recombinante, se pueden generar variantes para mejorar o alterar las características de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, se pueden suprimir uno o más aminoácidos del extremo N o el extremo C del polipéptido de la presente invención sin pérdida sustancial de función biológica. Como ejemplo, Ron et al. (J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993)) informaron sobre proteínas KGF variantes que tienen actividad de unión a heparina incluso después de suprimir 3, 8, o 27 residuos de aminoácido amino terminales. De un modo similar, el interferón gamma mostró una actividad hasta diez veces más alta después de suprimir 8-10 residuos de aminoácido del extremo carboxi de esta proteína. (Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988).)

Por otra parte, una amplia evidencia demuestra que las variantes a menudo conservan una actividad biológica similar a la de la proteína de origen natural. Por ejemplo, Gayle y col. (J. Biol. Chem. 268:22105-22111 (1993)) llevaron a cabo análisis mutacionales exhaustivos de la citoquina IL-1a humana. Utilizaron la mutagénesis al azar para generar más de 3.500 mutantes de IL-1a individuales que promediaban 2,5 cambios de aminoácidos por variante a lo largo de toda la molécula. Se examinaron múltiples mutaciones en cada posible posición de aminoácido. Los investigadores encontraron que "[la mayor parte de la molécula podía ser alterada con un pequeño efecto sobre la actividad de unión o biológica]". De hecho, solamente 23 secuencias de aminoácidos, de más de 3.500 secuencias de nucleótidos examinadas, produjeron una proteína que difería significativamente en su actividad de la de tipo salvaje.

Además, incluso si la supresión de uno o más aminoácidos del extremo N o el extremo C de un polipéptido produce una modificación o pérdida de una o más funciones biológicas, todavía se pueden conservar otras actividades

biológicas. Por ejemplo, la capacidad de una variante por delección para inducir y/o unirse a anticuerpos que reconocen la forma secretada probablemente será conservada cuando menos de la mayoría de los residuos de la forma secretada se elimine del extremo N o el extremo C. El que un polipéptido concreto que carece de residuos N o C-terminales de una proteína conserve tales actividades inmunogénicas puede ser fácilmente determinado por métodos rutinarios descritos en la presente memoria y conocidos de otro modo en la técnica.

De este modo, la invención incluye adicionalmente variantes de polipéptidos que tienen una actividad funcional (p. ej., actividad biológica y/o actividad terapéutica). En una realización, la invención proporciona variantes de proteínas de fusión de albúmina que tienen una actividad funcional (p. ej., actividad biológica y/o actividad terapéutica) que corresponde a una o más actividades biológicas y/o terapéuticas de la proteína Terapéutica correspondiente a la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina. En otra realización, la invención proporciona variantes de proteínas de fusión que tienen una actividad funcional (p. ej., actividad biológica y/o actividad terapéutica) que corresponde a una o más actividades biológicas y/o terapéuticas de la proteína Terapéutica correspondiente a la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina. Tales variantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones, y sustituciones seleccionadas de acuerdo con las reglas generales conocidas en la técnica con el fin de que tengan poco efecto sobre la actividad. Los polinucleótidos que codifican tales variantes también están incluidos en la invención.

En realizaciones preferidas, las variantes de la invención tienen sustituciones conservativas. Por "sustituciones conservativas" se quieren significar canjes dentro de grupos tales como el remplazo de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile; el remplazo de los residuos hidroxilados Ser y Thr; el remplazo de los residuos ácidos Asp y Glu; el remplazo de los residuos amídicos Asn y Gln, el remplazo de los residuos alcalinos Lys, Arg, e His; el remplazo de los residuos aromáticos Phe, Tyr, y Trp, y el remplazo de los aminoácidos de pequeño tamaño Ala, Ser, Thr, Met, y Gly.

Las pautas concernientes a cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas son proporcionadas, por ejemplo, por Bowie et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", Science 247:1306-1310 (1990), en donde los autores indican que existen dos estrategias principales para el estudio de la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio.

La primera estrategia explota la tolerancia de las sustituciones de aminoácidos mediante selección natural durante el proceso de evolución. Comparando las secuencias de aminoácidos en diferentes especies, se pueden identificar aminoácidos conservados. Estos aminoácidos conservados son probablemente importantes para la función de la proteína. En contraste, las posiciones de aminoácidos donde se han tolerado sustituciones por la selección natural indican que estas posiciones no son críticas para la función de la proteína. De este modo, las posiciones que toleran una sustitución de aminoácido podrían ser modificadas a la vez que conservarían la actividad biológica de la proteína.

La segunda estrategia utiliza la modificación genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar regiones críticas para la función de la proteína. Por ejemplo, se puede utilizar la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis de barrido con alanina (introducción de sustituciones de alanina individuales en cada residuo de la molécula). Véase Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085 (1989). Las moléculas mutantes resultantes se pueden someter a ensayo después para determinar la actividad biológica.

Como establecen los autores, estas dos estrategias han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos. Los autores indican adicionalmente qué cambios de aminoácidos es probable que sean permisivos en ciertas porciones de aminoácidos de la proteína. Por ejemplo, los residuos de aminoácido más ocultos (dentro de la estructura terciaria de la proteína) requieren cadenas laterales no polares, mientras que generalmente se conservan pocos rasgos de las cadenas laterales de la superficie. Por otra parte, las sustituciones de aminoácidos conservativas, toleradas implican el remplazo de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile; el remplazo de los residuos hidroxilados Ser y Thr; el remplazo de los residuos ácidos Asp y Glu; el remplazo de los residuos amídicos Asn y Gln, el remplazo de los residuos alcalinos Lys, Arg, e His; el remplazo de los residuos aromáticos Phe, Tyr, y Trp, y el remplazo de los aminoácidos de pequeño tamaño Ala, Ser, Thr, Met, y Gly. Además de la sustitución de aminoácidos conservativa, las variantes de la presente invención incluyen (i) polipéptidos que contienen sustituciones de uno o más residuos de aminoácido no conservados, donde los residuos de aminoácido sustituidos pueden estar codificados o no por el código genético, o (ii) polipéptidos que contienen sustituciones de uno o más residuos de aminoácido que tienen un grupo sustituyente, o (iii) polipéptidos que han sido fusionados con o conjugados químicamente a otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la estabilidad y/o solubilidad del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), (iv) polipéptidos que contienen aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo, un péptido de la región de fusión de Fc de IgG. Se considera que tales polipéptidos variantes están dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

Por ejemplo, las variantes de polipéptidos que contienen sustituciones de aminoácidos cargados por otros aminoácidos cargados o neutros pueden producir proteínas con características mejoradas, tales como una menor agregación. La agregación de formulaciones farmacéuticas tanto reduce la actividad como aumenta el aclaramiento debido a la actividad inmunogénica de los productos agregados. Véanse Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331-

340 (1967); Robbins et al., Diabetes 36: 838-845 (1987); Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993).

En realizaciones específicas, los polipéptidos de la invención comprenden, o alternativamente, consisten en, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de albúmina, la secuencia de aminoácidos de una proteína Terapéutica y/o albúmina de suero humana, en donde los fragmentos o variantes tienen 1-5, 5-10, 5-25, 5-50, 10-50 o 50-150, adiciones, sustituciones, y/o deleciones de residuos de aminoácido cuando se comparan con la secuencia de aminoácidos de referencia. En realizaciones preferidas, las sustituciones de aminoácidos son conservativas. Los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos también están incluidos en la invención.

El polipéptido de la presente invención puede estar compuesto por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y puede contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por los genes. Los polipéptidos pueden ser modificados mediante cualquier procedimiento natural, tal como el procesamiento post-traduccion, o mediante mecanismos de modificación química que son bien conocidos en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en los textos básicos y en monografías más detalladas, así como en voluminosas publicaciones de investigación. Las modificaciones se pueden producir en cualquier parte de un polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de los aminoácidos o los extremos carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en varios sitios de un polipéptido dado. Asimismo, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de ubicuitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados, y cíclicos ramificados pueden resultar de procedimientos naturales post-traducción o se pueden elaborar mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, anclaje covalente de flavina, anclaje covalente de un radical hemo, anclaje covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, anclaje covalente de un lípido o derivado de lípido, anclaje covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclas de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por transferencia de ARN tal como arginilación, y ubicuitinación. (Véanse, por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)).

Actividad funcional

"Un polipéptido que tiene actividad funcional" se refiere a un polipéptido capaz de presentar una o más actividades funcionales conocidas asociadas con la pro-proteína completa, y/o la forma madura de la proteína Terapéutica. Tales actividades funcionales incluyen, pero no se limitan a, la actividad biológica, la antigenicidad [la capacidad para unirse (o competir con un polipéptido por la unión) a un anticuerpo anti-polipéptido], la inmunogenicidad (la capacidad para generar anticuerpos que se unen a un polipéptido específico de la invención), la capacidad para formar multímeros con polipéptidos de la invención, y la capacidad para unirse a un receptor o ligando para un polipéptido.

"Un polipéptido que tiene actividad biológica" se refiere a un polipéptido que muestra una actividad similar a, pero no necesariamente idéntica a, una actividad de la proteína Terapéutica de la presente invención, incluyendo las formas maduras, medida en un análisis biológico concreto, con o sin dependencia de la dosis. En el caso en el que existe dependencia de la dosis, no es necesario que esta sea idéntica a la del polipéptido, sino sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con el polipéptido de la presente invención (esto es, el polipéptido candidato mostrará una mayor actividad o una actividad no más de aproximadamente 25 veces menor y, preferiblemente, no más de aproximadamente diez veces menor, y muy preferiblemente, una actividad de no más de aproximadamente tres veces menor con respecto al polipéptido de la presente invención).

En realizaciones preferidas, una proteína de fusión de albúmina de la invención tiene al menos una actividad biológica y/o terapéutica asociada con la porción de proteína Terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma) cuando ésta no está fusionada a albúmina.

En realizaciones preferidas adicionales, la proteína de fusión de albúmina de la invención tiene una mayor estabilidad en plasma en comparación con la porción de proteína Terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma) en un estado no fusionado. La estabilidad en plasma de la proteína de fusión de albúmina de la invención o de la porción de proteína Terapéutica no fusionada (o un fragmento o una variante de la misma) se puede analizar utilizando o modificando de manera rutinaria análisis conocidos en la técnica.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden analizar para determinar la actividad funcional (p. ej., la actividad biológica) utilizando o modificando de manera rutinaria análisis conocidos en la técnica, así como

análisis descritos en la presente memoria. Adicionalmente, un experto en la técnica puede analizar de manera rutinaria fragmentos de una proteína Terapéutica correspondiente a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina, para determinar la actividad utilizando análisis referidos en su correspondiente fila de la Tabla 1 (p. ej., en la columna 3 de la Tabla 1). Adicionalmente, un experto en la técnica puede analizar de manera rutinaria fragmentos de una proteína de albúmina correspondiente a una porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina, para determinar la actividad utilizando análisis conocidos en la técnica y/o como se describe en la sección de Ejemplos de más abajo.

Por ejemplo, en una realización donde se está analizando la capacidad de una proteína de fusión de albúmina para unirse o competir con una proteína Terapéutica por la unión a un anticuerpo anti-polipéptido Terapéutico y/o un anticuerpo anti-albúmina, se pueden utilizar varios inmunoanálisis conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados a, sistemas de análisis competitivos y no competitivos utilizando mecanismos tales como radioinmunoanálisis, ELISA (análisis de inmunoabsorción con enzima ligada), inmunoanálisis "sándwich", análisis inmunoradiométricos, reacciones de precipitación con difusión en gel, análisis de inmunodifusión, inmunoanálisis in situ (utilizando oro coloidal, marcas enzimáticas o radioisótopos, por ejemplo), transferencias western, reacciones de precipitación, análisis de aglutinación (p. ej., análisis de aglutinación en gel, análisis de hemaglutinación), análisis de fijación del complemento, análisis de inmunofluorescencia, análisis de proteína A, y análisis de inmunoelectroforesis, etc. En una realización, la unión al anticuerpo se detecta detectando una marca en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta detectando la unión de un anticuerpo secundario o un reactivo al anticuerpo primario. En una realización adicional, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen en la técnica muchos métodos para detectar la unión en un inmunoanálisis y están dentro del alcance de la presente invención.

En una realización preferida, en la que se identifica un compañero de unión (p. ej., un receptor o un ligando) de la proteína Terapéutica, se puede analizar la unión de ese compañero de unión por medio de una proteína de fusión de albúmina que comprende esa proteína Terapéutica como la porción de proteína Terapéutica de la fusión, p. ej., por medio de métodos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía en gel reductora y no reductora, cromatografía de afinidad con proteína, y transferencia por afinidad. Véase en general, Phizicky et al., *Microbial. Rev.* 59:94-123 (1995). En otra realización, se puede analizar la capacidad de correlacionarse fisiológicamente de una proteína de fusión de albúmina para unirse a uno o varios sustratos del polipéptido Terapéutico correspondiente a la porción de proteína Terapéutica de la fusión de manera rutinaria utilizando mecanismos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, en la que se está evaluando la capacidad de una proteína de fusión de albúmina para formar multímeros, la asociación con otros componentes del multímero se puede analizar, p. ej., mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía en gel reductora y no reductora, cromatografía de afinidad con proteína, y transferencia por afinidad. Véase, en general Phizicky et al., *supra*.

En realizaciones preferidas, una proteína de fusión de albúmina que comprende la totalidad o una porción de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, tiene al menos una actividad biológica y/o terapéutica (p. ej., para unirse específicamente a un polipéptido o epítipo) asociada con el anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma) cuando ésta no está fusionada a albúmina. En otras realizaciones preferidas, la actividad biológica y/o la actividad terapéutica de una proteína de fusión de albúmina que comprende la totalidad o una porción de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica es la inhibición (es decir, antagonismo) o la activación (es decir, agonismo) de una o más actividades biológicas y/o actividades terapéuticas asociadas con el polipéptido que está específicamente unido a un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica.

Las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica pueden ser caracterizadas de diversas maneras. En particular, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica pueden ser analizadas por su capacidad para unirse específicamente a los mismos antígenos unidos específicamente por el anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica correspondiente a la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina utilizando mecanismos descritos en la presente memoria o mecanismos modificadores rutinarios conocidos en la técnica.

Los análisis para determinar la capacidad de las proteínas de fusión de albúmina (p. ej., que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica) para unirse (específicamente) a una proteína o epítipo específico se pueden llevar a cabo en disolución (p. ej., Houghten, *Bio/Techniques* 13:412-421(1992)), sobre cuentas (p. ej., Lam, *Nature* 354:82-84 (1991)), sobre chips (p. ej., Fodor, *Nature* 364:555-556 (1993)), sobre bacterias (p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409), sobre esporas (p. ej., Patentes Núms. 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), sobre plásmidos (p. ej., Cull et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869 (1992)) o sobre fagos (p. ej., Scott y Smith, *Science* 249:386-390 (1990); Devlin, *Science* 249:404-406 (1990); Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382 (1990); y Felici, *J. Mol. Biol.* 222:301-310 (1991)) (cada una de estas referencias se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad). Las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo Terapéutico también se pueden analizar para determinar su especificidad y afinidad por una proteína o epítipo específicos utilizando o modificando rutinariamente mecanismos descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica.

Las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica se pueden analizar para determinar la reactividad cruzada con otros antígenos (p. ej., moléculas que tienen conservación de la secuencias/estructura con las moléculas unidas específicamente por el anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma) correspondiente a la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina de la invención) mediante cualquier método conocido en la técnica.

Los inmunoanálisis que se pueden utilizar para analizar la unión (inmunoespecífica) y la reactividad cruzada incluyen, pero no se limitan a, sistemas de análisis competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como transferencias western, radioinmunoanálisis, ELISA (análisis de inmuoabsorción con enzima ligada), inmunoanálisis "sándwich", análisis de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, análisis de inmunodifusión, análisis de aglutinación, análisis de fijación del complemento, análisis inmunoradiométricos, inmunoanálisis fluorescentes, e inmunoanálisis con proteína A, por nombrar solamente unos pocos. Tales análisis son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad). Los inmunoanálisis ilustrativos se describen brevemente más abajo (pero no o a modo de limitación).

Los protocolos de inmunoprecipitación comprenden generalmente la lisis de una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (NP-40 o Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, SDS al 0,1%, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2, Trasylol al 1%) con un suplemento de inhibidores de proteína fosfatasa y/o proteasa (p. ej., EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), la adición de la proteína de fusión de albúmina de la invención (p. ej., que comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica) al producto lisado celular, la incubación durante un período de tiempo (p. ej., 1 a 4 horas) a 40 grados C, la adición de cuentas de sefarsa acopladas a un anticuerpo anti-albúmina, por ejemplo, al producto lisado celular, la incubación durante aproximadamente una hora o más a 40 grados C, el lavado de las cuentas en tampón de lisis y la resuspensión de las cuentas en SDS/tampón de muestra. La capacidad de la proteína de fusión de albúmina para inmunoprecipitar un antígeno concreto se puede evaluar, p. ej., mediante análisis de transferencia western. Un experto en la técnica estaría informado de los parámetros que se pueden modificar para incrementar la unión de la proteína de fusión de albúmina a un antígeno y disminuir el fondo (p. ej., aclarando previamente el producto lisado celular con cuentas de sefarsa). Para una discusión adicional referente a los protocolos de inmunoprecipitación véase, p. ej., Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.16.1.

El análisis de transferencia Western comprende generalmente la preparación de muestras de proteínas, la electroforesis de las muestras de proteínas en un gel de poliacrilamida (p. ej., SDS-PAGE al 8%-20% dependiendo del peso molecular del antígeno), la transferencia de la muestra de proteína del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, el bloqueo de la membrana en solución de bloqueo (p. ej., PBS con BSA al 3% o leche desnatada), el lavado de la membrana en tampón de lavado (p. ej., PBS-Tween 20), la aplicación de la proteína de fusión de albúmina de la invención (diluida en tampón de bloqueo) a la membrana, el lavado de la membrana en tampón de lavado, la aplicación de un anticuerpo secundario (que reconoce la proteína de fusión de albúmina, p. ej., anticuerpo anti-albúmina de suero humana) conjugado con un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o con una molécula radiactiva (p. ej., ^{32}P o ^{125}I) diluidos en tampón de bloqueo, el lavado de la membrana en tampón de lavado, y la detección de la presencia del antígeno. Un experto en la técnica tendría conocimientos sobre los parámetros que se podrían modificar para incrementar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para una discusión adicional referente a los protocolos de transferencia western véase, p. ej., Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.8.1.

Los ELISA comprenden la preparación del antígeno, el recubrimiento del pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, el lavado del antígeno que no se unió a los pocillos, la adición de la proteína de fusión de albúmina (p. ej., que comprende al menos un fragmento o variante de anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica) de la invención conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) a los pocillos y la incubación durante un período de tiempo, el lavado de las proteínas de fusión de albúmina no unidas o unidas no específicamente, y la detección de la presencia de las proteínas de fusión de albúmina específicamente unidas al antígeno que recubre el pocillo. En los ELISA la proteína de fusión de albúmina no tiene que estar conjugada con un compuesto detectable; en lugar de eso, se puede añadir al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce la proteína de fusión de albúmina) conjugado a un compuesto detectable. Adicionalmente, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, la proteína de fusión de albúmina puede aplicarse como recubrimiento sobre el pocillo. En este caso, la molécula detectable podría ser el antígeno conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina). Un experto en la técnica tendría conocimiento de los parámetros que se pueden modificar para incrementar la señal detectada así como otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica. Para una discusión adicional referente a los ELISA véase, p. ej., Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1.

La afinidad de unión de una proteína de fusión de albúmina a una proteína, antígeno, o epítipo y la velocidad de

disociación de una interacción proteína de fusión de albúmina-proteína/antígeno/epítipo se puede determinar por medio de análisis de unión competitiva. Un ejemplo de un análisis de unión competitiva es un radioinmunoanálisis que comprende la incubación de antígeno marcado (p. ej., ^3H o ^{125}I) con la proteína de fusión de albúmina de la invención en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad de la proteína de fusión de albúmina por una proteína, antígeno, o epítipo específicos y las velocidades de disociación de la unión se pueden determinar a partir de los datos mediante análisis de gráficos de Scatchard. La competición con una segunda proteína que se une a la misma proteína, antígeno o epítipo que la proteína de fusión de albúmina, también se puede determinar utilizando radioinmunoanálisis. En este caso, la proteína, antígeno o epítipo se incuban con una proteína de fusión de albúmina conjugada con un compuesto marcado (p. ej., ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de una segunda proteína no marcada que se une a la misma proteína, antígeno, o epítipo que la proteína de fusión de albúmina de la invención.

En una realización preferida, se utiliza el análisis cinético BIAcore para determinar las velocidades de asociación y disociación de la unión de las proteínas de fusión de albúmina de la invención a una proteína, antígeno o epítipo. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y la disociación de las proteínas de fusión de albúmina, o polipéptidos, antígenos o epítopos específicos de los chips con polipéptidos, antígenos o epítopos o proteínas de fusión de albúmina específicos inmovilizados, respectivamente, sobre su superficie.

Los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica correspondiente a la porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina también se pueden describir o especificar en términos de su afinidad de unión por una proteína o antígenos dados, preferiblemente el antígeno al que se pueden unir específicamente. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d menor de $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, 10^{-2} M , $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, 10^{-3} M , $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, 10^{-4} M . Las afinidades de unión más preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d menor de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 10^{-5} M , $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, 10^{-6} M , $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, 10^{-7} M , $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ o 10^{-8} M . Las afinidades de unión aún más preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d menor de $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, 10^{-9} M , $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, 10^{-10} M , $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, 10^{-11} M , $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, 10^{-12} M , $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, 10^{-13} M , $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, 10^{-14} M , $5 \times 10^{-15} \text{ M}$, o 10^{-15} M . En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, tienen una afinidad por una proteína o epítipo dados similar a la del correspondiente anticuerpo (no fusionado a albúmina) que se une a una proteína Terapéutica, teniendo en cuenta la valencia de la proteína de fusión de albúmina (que comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica) y la valencia del correspondiente anticuerpo. Además, los análisis descritos en la presente memoria (véanse los Ejemplos y la Tabla 1) y conocidos de otro modo en la técnica se pueden aplicar de manera rutinaria para medir la capacidad de las proteínas de fusión de albúmina y los fragmentos, variantes y derivados de los mismos para provocar una actividad biológica y/o una actividad Terapéutica (*in vitro* o *in vivo*) relacionadas con la porción de proteína Terapéutica y/o la porción de albúmina de la proteína de fusión de albúmina. Otros métodos serán conocidos por el experto en la técnica y están dentro del alcance de la invención.

Albúmina

Como se ha descrito anteriormente, una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos un fragmento o variante de una proteína Terapéutica y al menos un fragmento o variante de albúmina de suero humana, que están asociados entre sí, preferiblemente mediante fusión genética.

Una realización adicional comprende al menos un fragmento o variante de una proteína Terapéutica y al menos un fragmento o variante de albúmina de suero humana, que están conectados entre sí por conjugación química.

Los términos, albúmina de suero humana (HSA) y albúmina humana (HA) se utilizan indistintamente en la presente memoria. Los términos, "albúmina" y "albúmina de suero" son más amplios, e incluyen albúmina de suero humana (y fragmentos y variantes de la misma) así como albúmina de otras especies (y fragmentos y variantes de la misma).

Según se utiliza en la presente memoria, "albúmina" se refiere colectivamente a la secuencia de proteína o aminoácidos de la albúmina, o un fragmento o variante de albúmina, que tiene una o más actividades funcionales (p. ej., actividades biológicas) de la albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a albúmina humana o fragmentos de la misma (véanse por ejemplo, los documentos EP 201 239, EP 322 094 WO 97/24445, WO95/23857) especialmente la forma madura de la albúmina humana como se muestra en la Figura 1 y en el SEQ ID NO: 1, o albúmina de otros vertebrados o fragmentos de la misma, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de las mismas.

En realizaciones preferidas, la proteína albúmina de suero humana utilizada en las proteínas de fusión de albúmina de la invención contiene uno o ambos de los siguientes conjuntos de mutaciones puntuales con referencia al SEQ ID NO: 1: Leu-407 to Ala, Leu-408 a Val, Val-409 a Ala, y Arg-410 a Ala; o Arg-410 a A, Lys-413 a Gln, y Lys-414 a Gln (véase, p. ej., la Publicación Internacional Núm. WO95/23857, incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad). En realizaciones incluso más preferidas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención que contienen uno o ambos de los conjuntos de mutaciones puntuales descritos anteriormente tienen una estabilidad/resistencia mejoradas a la escisión proteolítica por Yap3p de levadura, permitiendo una mayor producción de proteínas de fusión de albúmina recombinantes expresadas en células anfitrionas de levadura.

Según se utiliza en la presente memoria, una porción de albúmina suficiente para prolongar la actividad terapéutica o la estabilidad en plasma o la vida útil de la proteína Terapéutica se refiere a una porción de albúmina de longitud o estructura suficientes para estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o la estabilidad en plasma de la proteína de manera que la vida útil o la estabilidad en plasma de la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina se prolonga o amplía en comparación con la vida útil o la estabilidad en plasma en el estado de no fusión. La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina puede comprender la totalidad de la secuencia de HA como se ha descrito anteriormente, o puede incluir uno o más fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Tales fragmentos pueden tener 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50, o más aminoácidos contiguos de la secuencia de HA o pueden incluir parte o todos los dominios específicos de HA. Por ejemplo, se pueden utilizar uno o más fragmentos de HA que abarcan los dos primeros dominios de tipo inmunoglobulina. En una realización preferida, el fragmento de HA es la forma madura de HA.

La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina de la invención puede ser una variante de HA normal. La porción de proteína Terapéutica de las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden ser variantes de las proteínas Terapéuticas como se describe en la presente memoria. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sean conservativa o no conservativas, donde tales cambios no alteran sustancialmente una o más de las propiedades oncóticas, de unión al ligando y no inmunogénicas útiles de la albúmina, o el sitio activo, o dominio activo que confiere las actividades terapéuticas de las proteínas Terapéuticas.

En particular, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana, por ejemplo aquellos fragmentos descritos en el documento EP 322 094 (esto es HA (Pn), donde n es de 369 a 419). La albúmina puede derivar de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo ser humano, vaca, oveja, o cerdo. Las albúminas que no son de mamífero incluyen, pero no se limitan a, gallina y salmón. La porción de albúmina de la proteína de fusión de albúmina puede ser de un animal diferente que la porción de proteína Terapéutica.

En términos generales, un fragmento o variante de HA tendrá al menos 100 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 150 aminoácidos de longitud. La variante de HA puede consistir en o alternativamente comprender al menos un dominio completo de HA, por ejemplo dominios 1 (aminoácidos 1-194 del SEQ ID NO: 1), dominio 2 (aminoácidos 195-387 del SEQ ID NO: 1), dominio 3 (aminoácidos 388-585 del SEQ ID NO: 1), dominios 1 y 2 (1-387 del SEQ ID NO:1), dominios 2 y 3 (195-585 del SEQ ID NO:1) o dominios 1 y 3 (aminoácidos 1-194 del SEQ ID NO: 1 y aminoácidos 388-585 del SEQ ID NO: 1). Cada dominio está formado a su vez por dos subdominios homólogos, a saber 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones conectoras inter-subdominio flexibles que comprenden los residuos Lys 106 a Glu 119, Glu 292 a Val 1315 y Glu 492 a Ala 511.

Preferiblemente, la porción de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos un subdominio o dominio de HA o modificaciones conservativas del mismo. Si la fusión se basa en subdominios, algunos o todos los conectores adyacentes se utilizan preferiblemente para conectar al radical de la proteína Terapéutica.

Los anticuerpos que se unen específicamente a proteínas Terapéuticas también son proteínas Terapéuticas

La presente descripción también incluye proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína Terapéutica descrita en la Tabla 1. Se contempla específicamente que el término "proteína Terapéutica" incluya anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica (p. ej., como se describe en la columna 1 de la Tabla 1) y a fragmentos y variantes de la misma. De este modo una proteína de fusión de albúmina de la descripción puede contener al menos un fragmento o variante de una proteína Terapéutica, y/o al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica.

Estructura de anticuerpo y antecedentes

Se sabe que la unidad estructural del anticuerpo básico comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. Véase en general, Fundamental Immunology Capítulos 3-5 (Paul, W., ed., 4ª ed. Raven Press, N.Y. (1998)) (incorporada como referencia en su totalidad para todos los propósitos). Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión al anticuerpo.

De este modo, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos.

Las cadenas muestran todas la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR.

Las regiones CDR, en general, son las porciones del anticuerpo que hacen contacto con el antígeno y determinan su especificidad. Las CDR de las cadenas pesadas y ligeras de cada par están alineadas por las regiones marco, permitiendo la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N al extremo C, ambas regiones variables de las cadenas tanto ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables están conectadas a la región constante de la cadena pesada o ligera. La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989).

Según se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo" hace referencia a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno (p. ej., una molécula que contiene una o más regiones CDR de un anticuerpo). Los anticuerpos que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla (p. ej., Fv de cadena sencilla), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, p. ej., anticuerpos anti-Id específicos para anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores (p. ej., dominios VH, dominios VL, o una o más regiones CDR).

Anticuerpos que se unen a Proteínas Terapéuticas

La presente descripción incluye proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una Proteína Terapéutica (p. ej., como se describe en la Tabla 1) o fragmento o variante de la misma.

Los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica (o un fragmento o variante de la misma) pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos (p. ej., de ratón y rata), de burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo, o pollo. Muy preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos. Según se utiliza en la presente memoria, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas y Xenomice u otros organismos que hayan sido modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos.

Las moléculas de anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. En realizaciones preferidas, las moléculas de anticuerpo que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina son IgG1. En otras realizaciones preferidas, las moléculas de inmunoglobulina que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina son IgG2. En otras realizaciones preferidas, las moléculas de inmunoglobulina que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina son IgG4.

Lo más preferiblemente los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina son fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno humanos de la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab)2, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv conectados por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, incluyendo los anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender las regiones variables solas o combinadas con la totalidad o con una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2, y CH3.

Los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de una proteína Terapéutica o pueden ser específicos tanto para una proteína Terapéutica como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, p. ej., las Publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

Los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica (o un fragmento o variante de la misma) pueden ser biespecíficos o bifuncionales lo que significa que el anticuerpo es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser producidos por una variedad de métodos incluyendo la fusión de hibridomas o la conexión de fragmentos Fab'. Véase, p. ej., Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. J Immunol. 148:1547-1553 (1992). Además, los anticuerpos biespecíficos se pueden formar como "diacuerpos" (Holliger et al. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments" PNAS USA 90:6444-6448 (1993)) o "Janusinas" (Traunecker et al.

"Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" EMBO J 10:3655-3659 (1991) y Traunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" Jnt J Cancer Supl 7:51-52 (1992)).

La presente descripción también proporciona proteínas de fusión de albúmina que comprenden fragmentos o variantes (incluyendo derivados) de un anticuerpo descrito en la presente memoria o conocido en otro lugar en la técnica. Se pueden utilizar los mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de la invención, incluyendo, por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las variantes (incluyendo los derivados) codifican sustituciones de menos de 50 aminoácidos, sustituciones de menos de 40 aminoácidos, sustituciones de menos de 30 aminoácidos, sustituciones de menos de 25 aminoácidos, sustituciones de menos de 20 aminoácidos, sustituciones de menos de 15 aminoácidos, sustituciones de menos de 10 aminoácidos, sustituciones de menos de 5 aminoácidos, sustituciones de menos de 4 aminoácidos, sustituciones de menos de 3 aminoácidos, o sustituciones de menos de 2 aminoácidos con respecto al dominio VH, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, dominio VL, VLCDR1, VLCDR2, o VLCDR3 de referencia. En realizaciones específicas, las variantes codifican sustituciones de VHCDR3. En una realización preferida, las variantes tienen sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más residuos de aminoácido no esenciales pronosticados.

Los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina pueden ser descritos o especificados en términos de los epítopos o porciones de la proteína Terapéutica que reconocen o a la que se unen específicamente. Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína Terapéutica o un epítipo específico de una proteína Terapéutica también se pueden excluir. Por lo tanto, la presente descripción incluye anticuerpos que se unen específicamente a proteínas Terapéuticas, y permite la exclusión de los mismos. En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, se unen a los mismos epítopos que el fragmento o variante no fusionados de ese mismo anticuerpo.

Los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina también pueden ser descritos o especificados en términos de su reactividad cruzada. Están incluidos los anticuerpos que no se unen a ningún otro análogo, ortólogo, u homólogo de una proteína Terapéutica. Los anticuerpos que se unen a polipéptidos con una identidad de secuencia de al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55%, y al menos 50% (calculada utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria) con una proteína Terapéutica también están incluidos en la presente descripción. En realizaciones específicas, los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina presentan reacción cruzada con homólogos murinos, de rata y/o de conejo de proteínas humanas y los correspondientes epítopos de las mismas. Los anticuerpos que no se unen a polipéptidos con una identidad de secuencia de menos de 95%, menos de 90%, menos de 85%, menos de 80%, menos de 75%, menos de 70%, menos de 65%, menos de 60%, menos de 55%, y menos de 50% (calculada utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria) con una proteína Terapéutica también están incluidos en la presente invención. En una realización específica, la reactividad cruzada descrita anteriormente es con respecto a cualquier polipéptido antigénico o inmunogénico específico individual, o combinaciones de 2, 3, 4, 5, o más de los polipéptidos antigénicos y/o inmunogénicos específicos descritos en la presente memoria. En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, tienen características de reactividad cruzada similares o sustancialmente idénticas en comparación con el fragmento o variante de ese mismo anticuerpo concreto.

También se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos codificados por polinucleótidos que hibridan con un polinucleótido que codifica la proteína Terapéutica en condiciones de hibridación rigurosas (como se describe en la presente memoria). Los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención también se pueden describir o especificar en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la invención. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d menor de 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M. Las afinidades de unión más preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d menor de 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M o 10^{-8} M. Las afinidades de unión aún más preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d menor de 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M. En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, tienen una afinidad por una proteína o epítipo dados similar a la del correspondiente anticuerpo (no fusionado a albúmina) que se une a una proteína Terapéutica, tomando en consideración la valencia de la proteína de fusión de albúmina (que comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica) y la valencia del correspondiente anticuerpo.

La invención también proporciona anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo a un epítipo de una proteína Terapéutica determinada mediante cualquier método conocido en la técnica para determinar la

unión competitiva, por ejemplo, los inmunoanálisis descritos en la presente memoria. En realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión al epítipo en al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, o al menos 50%. En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, inhiben competitivamente la unión de un segundo anticuerpo a un epítipo de una proteína Terapéutica. En otras realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, inhiben competitivamente la unión de un segundo anticuerpo a un epítipo de una proteína Terapéutica en al menos 95%, al menos 90%, al menos 85 %, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, o al menos 50%.

Los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica y que pueden corresponder a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención pueden actuar como agonistas o antagonistas de la proteína Terapéutica. Por ejemplo, la presente descripción incluye anticuerpos que interrumpen las interacciones receptor/ligando con los polipéptidos de la invención parcial o totalmente. La descripción proporciona tanto los anticuerpos específicos del receptor como los anticuerpos específicos del ligando. La descripción también proporciona anticuerpos específicos de receptores que no evitan la unión al ligando pero evitan la activación del receptor. La activación del receptor (esto es, la señalización) se puede determinar mediante mecanismos descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica. Por ejemplo, la activación del receptor se puede determinar detectando la fosforilación (p. ej., tirosina o serina/treonina) del receptor o su sustrato mediante inmunoprecipitación seguida de análisis de transferencia western (por ejemplo, como se ha descrito más arriba). En realizaciones específicas, se proporcionan anticuerpos que inhiben la actividad del ligando o la actividad del receptor en al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, o al menos 50% de la actividad en ausencia del anticuerpo. En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, tienen características similares o sustancialmente similares con respecto a la prevención de la unión al ligando y/o la prevención de la activación del receptor en comparación con un fragmento o variante no fusionados del anticuerpo que se une a la proteína Terapéutica.

La descripción también proporciona anticuerpos específicos de receptores que evitan la unión al ligando como la activación del receptor así como anticuerpos que reconocen el complejo receptor-ligando, y, preferiblemente, no reconocen específicamente el receptor no unido o el ligando no unido. Del mismo modo, están incluidos en la invención anticuerpos neutralizadores que se unen al ligando y evitan la unión del ligando al receptor, así como los anticuerpos que se unen al ligando, evitando de ese modo la activación del receptor, pero no evitan que el ligando se una al receptor. Adicionalmente se incluyen en la descripción anticuerpos que activan el receptor. Estos anticuerpos pueden actuar como agonistas de receptores, es decir, potencian o activan todas o un subgrupo de las actividades biológicas de la activación del receptor mediada por el ligando, por ejemplo, induciendo la dímeroización del receptor. Los anticuerpos pueden ser especificados como agonistas, antagonistas o agonistas inversos para las actividades biológicas que comprenden las actividades biológicas específicas de las proteínas Terapéuticas (p. ej., como se describe en la Tabla 1). Los anticuerpos agonistas anteriores se pueden elaborar utilizando métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., la Publicación PCT WO 96/40281; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.811.097; Deng et al., Blood 92(6):1981-1988 (1998); Chen et al., Cancer Res. 58(16):3668-3678 (1998); Harrop et al., J. Immunol. 161(4):1786-1794 (1998); Zhu et al., Cancer Res. 58(15):3209-3214 (1998); Yoon et al., J. Immunol. 160(7):3170-3179 (1998); Prat et al., J. Cell. Sci. III(Pt2):237-247 (1998); Pitard et al., J. Immunol. Methods 205(2):177-190 (1997); Liautard et al., Cytokine 9(4):233-241 (1997); Carlson et al., J. Biol. Chem. 272(17):11295-11301 (1997); Taryman et al., Neuron 14(4):755-762 (1995); Muller et al., Structure 6(9):1153-1167 (1998); Bartunek et al., Cytokine 8(1): 14-20 (1996) (que se incorporan todas como referencia a la presente memoria en su totalidad). En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, tienen propiedades agonísticas o antagonísticas similares o sustancialmente idénticas a las de un fragmento o variante no fusionados del anticuerpo que se une a la proteína Terapéutica.

Los anticuerpos que se unen a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar, por ejemplo, para purificar, detectar, y dirigir proteínas Terapéuticas, incluyendo métodos de diagnóstico y terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos tienen utilidad en inmunoanálisis para la medición cualitativa y cuantitativa de los niveles de proteína Terapéutica en muestras biológicas. Véase, p. ej., Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); incorporada como referencia a la presente memoria en su totalidad. Del mismo modo, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, se pueden utilizar, por ejemplo, para purificar, detectar, y dirigir proteínas Terapéuticas, incluyendo métodos de diagnóstico y terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica incluyen derivados que se modifican, esto es, mediante anclaje covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados, p. ej., por medio de glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por medio de grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, conexión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante mecanismos conocidos, incluyendo, pero no limitados a

escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden modificar como se ha descrito anteriormente.

Métodos de producción de anticuerpos que se unen a Proteínas Terapéuticas

5 Los anticuerpos que se unen a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención pueden ser generados mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos policlonales para un antígeno de interés pueden ser producidos por medio de diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una proteína Terapéutica puede ser administrada a diversos animales anfitriones incluyendo, pero no limitados a, conejos, ratones, ratas, etc. para inducir la producción de sueros que
10 contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. Se pueden utilizar diversos coadyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies anfitrionas, e incluyen pero no se limitan a, el de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y coadyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y
15 *Corynebacterium parvum*. Tales coadyuvantes también son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando una amplia variedad de mecanismos conocidos en la técnica incluyendo el uso de las tecnologías de hibridomas, recombinantes, y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos utilizando mecanismos de hibridomas incluyendo los conocidas en la técnica e ilustrados, por ejemplo, por Harlow et al.,
20 *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (dichas referencias incorporadas como referencia en su totalidad). El término "anticuerpo monoclonal" según se utiliza en la presente memoria no está limitado a anticuerpos producidos por medio de la tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" hace referencia a un anticuerpo que deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico o de
25 fago, y no el método por el cual es producido.

Los métodos para producir y escrutar anticuerpos específicos utilizando la tecnología de hibridomas son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitante, los ratones pueden ser inmunizados con una proteína Terapéutica o fragmento o variante de la misma, una proteína de fusión de albúmina, o una célula que expresa
30 semejante proteína Terapéutica o fragmento o variante de la misma o proteína de fusión de albúmina. Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, p. ej., se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero de ratón, se cosecha el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan a continuación mediante mecanismos bien conocidos a cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células de la línea celular SP20 asequible de la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante dilución limitante. Los clones de hibridoma se analizan a continuación mediante métodos conocidos en la técnica para células que secretan
35 anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la invención. Se puede generar fluido de ascitis, que contiene generalmente elevados niveles de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona métodos de generación de anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo en donde, preferiblemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón
40 inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma y escrutando a continuación los hibridomas resultantes de la fusión para determinar los clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención.

Otro método bien conocido para producir líneas de células B humanas tanto policlonales como monoclonales es la transformación utilizando Virus de Epstein Barr (EBV). Los protocolos para generar líneas de células B transformadas con EBV son comúnmente conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, el protocolo esbozado en el Capítulo 7.22 de *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., 1994, John Wiley & Sons, NY, que se
45 incorpora a la presente en su totalidad como referencia. La fuente de células B para la transformación es comúnmente sangre periférica humana, pero las células B para la transformación también pueden derivar de otras fuentes incluyendo, pero no limitadas a, ganglios linfáticos, amígdala, bazo, tejido tumoral, y tejidos infectados. Los tejidos se elaboran en general en suspensiones de una sola célula antes de la transformación con EBV. Adicionalmente, se pueden adoptar etapas para eliminar físicamente o inactivar células T (p. ej., mediante
50 tratamiento con ciclosporina A) en muestras que contienen células B, debido a que las células T de los individuos seropositivos para anticuerpos anti-EBV pueden suprimir la inmortalización de las células B por EBV.

En general, a la muestra que contiene células B humanas se le inocula EBV, y se cultiva durante 3-4 semanas. Una
55 fuente típica de EBV es el sobrenadante de cultivo de la línea celular B95-8 (ATCC núm. VR-1492). Los signos físicos de transformación por EBV pueden ser generalmente observados hacia el final del período de cultivo de 3-4 semanas. Mediante microscopía de contraste de fases, las células transformadas pueden parecer grandes, claras, pilosas y tienden a agregarse en agrupaciones apretadas de células. Inicialmente, las líneas de EBV son generalmente policlonales. Sin embargo, a lo largo de períodos prolongados de cultivos celulares, las líneas de EBV
60 pueden volverse monoclonales o policlonales como resultado del crecimiento selectivo de clones de células B

concretos. Alternativamente, las líneas transformadas con EBV policlonal pueden ser subclonadas (p. ej., mediante cultivo en dilución limitante) o fusionadas con un compañero de fusión adecuado y cultivadas en placa a una dilución limitante para obtener líneas de células B monoclonales. Los compañeros de fusión adecuados para líneas celulares transformadas con EBV incluyen líneas celulares de mieloma de ratón (p. ej., SP2/0, X63-Ag8.653), líneas celulares de heteromieloma (humano x ratón; p. ej., SPAM-8, SBC-H20, y CB-F7), y líneas celulares humanas (p. ej., GM 1500, SK0-007, RPMI 8226, y KR-4). De este modo, la presente descripción también proporciona un método de generación de anticuerpos policlonales o monoclonales contra polipéptidos de la invención o fragmentos de los mismos, que comprende la transformación con EBV de células B humanas.

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos pueden ser generados mediante mecanismos conocidos. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab)2 de la invención pueden ser producidos por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab)2). Los fragmentos F(ab)2 contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a la proteína Terapéutica también pueden ser generados utilizando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan sobre la superficie de partículas de fagos que portan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En una realización concreta, semejante fago puede ser utilizado para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (p. ej., humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés puede ser seleccionado o identificado con un antígeno, p. ej., utilizando antígeno marcado o antígeno unido a o capturado por una superficie sólida o cuenta. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M 13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpos Fab, Fv o Fv estabilizados con disulfuro fusionados recombinantemente a la proteína del gen III o el gen VIII del fago. Los ejemplos de los métodos de presentación en fagos que se pueden utilizar para elaborar anticuerpos que se unen a la proteína Terapéutica incluyen los descritos por Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., 1. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); Solicitud PCT Núm. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/118619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108;.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección en fagos, las regiones codificantes de anticuerpo del fago pueden ser aisladas y utilizadas para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresadas en cualquier anfitrión deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, p. ej., como se describe con detalle a continuación. Por ejemplo, los mecanismos para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')2 también pueden ser empleados utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); y Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); y Better et al., Science 240:1041-1043 (1988).

Los ejemplos de los mecanismos que se pueden utilizar para producir Fv de cadena sencilla y anticuerpos incluyen aquellos descritos en las Patentes de los Estados Unidos 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); y Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988). Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y análisis de detección *in vitro*, puede ser preferible utilizar anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes especies animales, tales como los anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse p. ej., Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos del marco de las regiones marco humanas serán sustituidos por el correspondiente residuo del anticuerpo donador de la CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., mediante modelado de las interacciones de los residuos de la CDR y el marco para identificar los residuos del marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos inusuales del marco en posiciones concretas. (Véase, p. ej., Queen et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.585.089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)). Los anticuerpos pueden ser humanizados utilizando una variedad de mecanismos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.225.539; 5.530.011; y 5.585.089), técnicas de remodelación o reconstrucción de la superficie (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska, et al., PNAS 91:969-973 (1994)), e intercambio de cadenas (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.565.332).

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden ser elaborados mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente que utilizan bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse también, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/116654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741; cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Los anticuerpos humanos también pueden ser producidos utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humanas. Por ejemplo, se pueden introducir complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humanas al azar o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable, la región constante, y la región de diversidad humanas pueden ser introducidas en células madre embrionarias de ratón además de los genes de las cadenas pesada y ligera humanas. Los genes de inmunoglobulina de las cadenas pesada y ligera de ratón se pueden volver no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región JH evita la producción de anticuerpo endógeno. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. A continuación los ratones quiméricos se crían para producir una progenie homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de una manera normal con un antígeno seleccionado, p. ej., todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden ser obtenidos a partir de ratones transgénicos, inmunizados utilizando la tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de las células B, y con posterioridad experimentan cambio de clase y mutación somática. De este modo, utilizando semejante técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y de los protocolos para producir tales anticuerpos, véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Patente Europea Núm. 0 598 877; Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; 5.939.598; 6.075.181; y 6.114.598, que se incorporan como referencia a la presente memoria en su totalidad. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA) pueden ser contratadas para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar utilizando una técnica referida como "selección guiada". En este enfoque se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, p. ej., un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespersen et al., Bio/technology 12:899-903 (1988)).

Polinucleótidos que codifican anticuerpos

La descripción proporciona adicionalmente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo y fragmentos del mismo. La invención también incluye polinucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o alternativamente, menos rigurosas, p. ej., como se define más arriba, con polinucleótidos que codifican un anticuerpo, preferiblemente, que se une específicamente a la proteína Terapéutica, y más preferiblemente, un anticuerpo que se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la "proteína Terapéutica: X" descrita en la columna "SEQ ID NO: Z" de la Tabla 2.

Se pueden obtener polinucleótidos, y determinar la secuencia de nucleótidos mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede reunir a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (p. ej., como describen Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994)), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y la ligación de esos oligonucleótidos, y a continuación la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, se puede generar un polinucleótido que codifica un anticuerpo a partir de un ácido nucleico de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo concreto no se encuentra disponible, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo es conocida, se puede sintetizar químicamente un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina o se puede obtener a partir de una fuente adecuada (p. ej., una biblioteca de ADNc, o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o un ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A+, aislado de, cualquier tejido o célula que expresa el anticuerpo, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) mediante amplificación por PCR utilizando cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación utilizando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica concreta a identificar, p. ej., un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR se pueden clonar a continuación en vectores de clonación replicables utilizando cualquier método bien conocido en la técnica (Véase el Ejemplo 65).

Una vez que se determinan la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo se puede manipular utilizando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, p. ej., técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas por Sambrook et al., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel et al., eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, que se incorporan ambas como referencia a la presente memoria en su totalidad), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, deleciones, y/o inserciones de aminoácidos.

En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de la cadena pesada y/o ligera se pueden inspeccionar para identificar las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) mediante métodos que son bien conocidos en la técnica, p. ej., mediante comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de la secuencia. Utilizando técnicas de ADN recombinante rutinarias, se pueden insertar una o más de las CDR dentro de regiones marco, p. ej., en regiones marco humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se describe más arriba. Las regiones marco pueden ser regiones marco de origen natural o consenso, y preferiblemente regiones marco humanas (véase, p. ej., Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 (1998) para una enumeración de regiones marco humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y las CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la invención. Preferiblemente, como se ha comentado más arriba, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones marco, y, preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, tales métodos se pueden utilizar para realizar sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Otras alteraciones del polinucleótido están incluidas en la presente invención y dentro del conocimiento práctico de la técnica.

Adicionalmente, se pueden utilizar las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314:452-454 (1985)) mediante el empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón con una especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana con una actividad biológica apropiada. Como se ha descrito más arriba, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un mAAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, p. ej., anticuerpos humanizados.

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.946.778; Bird, *Science* 242:423-42 (1988); Huston et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); y Ward et al., *Nature* 334:544-54 (1989)) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman conectando los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácido, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla. También se pueden utilizar las técnicas para ensamblar fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., *Science* 242:1038-1041 (1988)).

Expresión recombinante de anticuerpos

La expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo del mismo, (p. ej., una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla), requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o porción del mismo (preferiblemente que contiene el dominio variable de la cadena pesada o ligera), de la invención, se puede producir el vector para la producción de la molécula de anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. De este modo, los métodos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo se describen en la presente memoria. Los métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden utilizar para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican anticuerpos y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. La descripción, de este modo, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de la cadena pesada o ligera, conectados operablemente a un promotor. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, p. ej., la publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en semejante vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa.

El vector de expresión se transfiere a una célula anfitriona mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan a continuación mediante mecanismos convencionales para producir un anticuerpo. De ese modo, la invención incluye células anfitrionas que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la

invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un anticuerpo de cadena sencilla, conectados operablemente a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican las cadenas tanto pesada como ligera pueden ser expresados simultáneamente en la célula anfitriona para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla más abajo.

- 5 Se puede utilizar una variedad de sistemas de anfitrión-vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo. Tales sistemas de anfitrión-vector de expresión representan vehículos por medio de los cuales pueden ser producidas las secuencias codificantes de interés y purificadas con posterioridad, pero también representan células que pueden expresar, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, una molécula de anticuerpo de la invención in situ. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (p. ej., células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (p. ej., promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (p. ej., el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia). Preferiblemente se utilizan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferiblemente, células eucarióticas, especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante completa, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, un sistema de expresión eficaz para anticuerpos consiste en células de mamífero tales como células de ovario de hámster Chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal de citomegalovirus humano (Foecking et al., *Gene* 45:101 (1986); Cockett et al., *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

- En los sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente numerosos vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que esté siendo expresada. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de semejante proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de niveles elevados de productos de proteínas de fusión que son fácilmente purificados. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., *EMBO J.* 2:1791 (1983)), en el que la secuencia codificante del anticuerpo se puede ligar individualmente en el vector en marco con la región codificante de lac Z de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)); y similares. También se pueden utilizar vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a cuentas de matriz de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para que incluyan sitios de escisión para las proteasas trombina o factor Xa de manera que el producto génico diana clonado pueda ser liberado del radical GST.

- En un sistema de insectos, se utiliza el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de la polihedrina) del virus y se puede colocar bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de la polihedrina).

- En células anfitrionas de mamífero, se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés se puede ligar a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, p. ej., el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede ser insertado a continuación en el genoma de adenovirus mediante recombinación in vitro o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (p. ej., la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en anfitriones infectados. (p. ej., véase Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359 (1984)). También se pueden requerir señales de iniciación específicas para una traducción eficaz de las secuencias codificantes de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control de la traducción y codones de iniciación exógenos pueden tener una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión se puede potenciar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner et al., *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987)).

- Adicionalmente, se puede seleccionar una cepa de célula anfitriona que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. Tales modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la

modificación post-traduccionales de las proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar líneas celulares o sistemas anfitriones apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea expresada. Con esta finalidad, se pueden utilizar células anfitrionas eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, la glicosilación, y la fosforilación del producto génico. Tales células anfitrionas de mamífero incluyen pero no se limitan a CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, y en particular, líneas celulares de cáncer de mama tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, líneas celulares de glándula mamaria normal tales como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción de alto rendimiento, a largo plazo, de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden modificar líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células anfitrionas se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (p. ej., promotores, potenciadores, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN foráneo, se puede permitir que las células modificadas crezcan durante 1-2 días en medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar loci que a su vez se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este método se puede utilizar ventajosamente para modificar líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Tales líneas celulares modificadas pueden ser particularmente útiles en el escrutinio y la evaluación de compuestos que interaccionan directamente o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Se pueden utilizar numerosos sistemas de selección, incluyendo pero no limitados a los genes de timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler et al., *Cell* 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202 (1992)), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., *Cell* 22:817 (1980)) en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Asimismo, se puede utilizar la resistencia a antimetabolitos como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., *Natl. Acad. Sci. USA* 77:357 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); Mayo, 1993, *TIB TECH* 11(5):155-215 (1993); e hgro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., *Gene* 30:147 (1984)). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante se pueden aplicar rutinariamente para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos son descritos, por ejemplo, por Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1(1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden incrementar mediante amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador del sistema de expresión que expresa el anticuerpo es amplificable, el incremento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula anfitriona incrementará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.* 3:257 (1983)).

Los vectores que utilizan glutamina sintasa (GS) o DHFR como marcadores seleccionables se pueden amplificar en presencia de los fármacos metionina sulfoximina o metotrexato, respectivamente. Una ventaja de los vectores basados en glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares (p. ej., la línea celular de mieloma murino, NSO) que son glutamina sintasa negativas. Los sistemas de expresión de glutamina sintasa también pueden funcionar en células que expresan glutamina sintasa (p. ej., células de ovario de hámster Chino (CHO)) proporcionando un inhibidor adicional para prevenir el funcionamiento del gen endógeno. Un sistema de expresión de glutamina sintasa y los componentes del mismo se detallan en las publicaciones PCT: WO87/04462; WO86/05807; WO89/01036; WO89/10404; y WO91106657. Adicionalmente, los vectores de expresión de glutamina sintasa que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención se encuentran disponibles en el mercado de proveedores, incluyendo, por ejemplo Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH). La expresión y producción de anticuerpos monoclonales que utilizan un sistema de expresión de GS en células de mieloma murino son descritas por Bebbington et al., *Biotechnology* 10: 169(1992) y por Biblia y Robinson *Biotechnol. Prog.* 11:1(1995).

La célula anfitriona se puede co-transfectar con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, se puede utilizar un único vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos tanto de la cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera se debe colocar antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322:52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197 (1980)). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que una molécula de anticuerpo ha sido producida por un animal, sintetizada químicamente, o expresada recombinantemente, puede ser purificada mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (p. ej., cromatografía en columna de intercambio iónico, de afinidad, concretamente de afinidad por el antígeno específico después de Proteína A, y clasificación por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen a la porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención o fragmentos de la misma se pueden fusionar con secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica, para facilitar la purificación.

10 Modificaciones de anticuerpos

Los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica o fragmentos o variantes se pueden fusionar a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otras, muchas de las cuales se encuentran disponibles en el mercado. Como describen Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporcionar una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina (también denominada "etiqueta de HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) y la etiqueta "flag".

La presente descripción incluye adicionalmente anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos se pueden utilizar como diagnóstico, por ejemplo, para controlar el desarrollo o progreso de un tumor como parte de un procedimiento de ensayo clínico, p. ej., para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede ser facilitada por el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones utilizando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar directamente al anticuerpo (o fragmento del mismo) o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un conector conocido en la técnica) utilizando mecanismos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.741.900 para iones metálicos que pueden ser conjugados con anticuerpos para su uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In o ⁹⁹Tc. Otros ejemplos de sustancias detectables han sido descritos en otra parte en la presente memoria.

Adicionalmente, un anticuerpo se puede conjugar con un radical terapéutico tal como una citotoxina, p. ej., un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, p. ej., emisores alfa tales como, por ejemplo, ²¹³Bi. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracinaodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos y homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil descabazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C, y cis- diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Los productos conjugados se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o radical farmacológico no se deben considerar limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el radical farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de difteria; una proteína tal factor de necrosis tumoral, interferón alfa, interferón beta, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente apoptótico, p. ej., TNF-alfa, TNF-beta, AIM I (Véase la Publicación Internacional Núm. WO 97/33899), AIM II (Véase la Publicación Internacional Núm. WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi et al., Int. Immunol. 6:1567-1574 (1994)), VEGF (Véase la Publicación Internacional Núm. WO 99/23105), un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulador de las colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de las colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Los anticuerpos también se pueden anclar a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoanálisis o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

Las técnicas para conjugar semejante radical terapéutico a anticuerpos son bien conocidas. Véanse, por ejemplo, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982).

Alternativamente, un anticuerpo se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un producto heteroconjugado de anticuerpo como describe Segal en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.676.980.

Se puede utilizar como agente terapéutico un anticuerpo, con o sin un radical terapéutico conjugado a él, se administra solo o combinado con uno o varios factores citotóxicos y/o una o varias citoquinas.

Fusión de anticuerpo-albúmina

Los anticuerpos que se unen a una porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica descrita en la columna "Proteína Terapéutica X" de la Tabla 1, o un fragmento o variante de la misma.

En realizaciones específicas, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, el dominio VH. En otras realizaciones, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a una proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, una, dos o tres CDR de VH. En otras realizaciones, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, la CDR1 de VH. En otras realizaciones, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, la CDR2 de VH. En otras realizaciones, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, la CDR3 de VH.

En realizaciones específicas, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, el dominio VL. En otras realizaciones, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, una, dos o tres CDR de VL. En otras realizaciones, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, la CDR1 de VL. En otras realizaciones, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, la CDR2 de VL. En otras realizaciones, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, la CDR3 de VL.

En otras realizaciones, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDR de VH y/o VL.

En realizaciones preferidas, el fragmento o variante de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína Terapéutica comprende, o alternatively consiste en, un scFv que comprende el dominio VH del anticuerpo Terapéutico, conectado al dominio VL del anticuerpo terapéutico por un conector peptídico tal como (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 4).

Inmunofenotipificación

Los anticuerpos o las proteínas de fusión de albúmina de la descripción que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma) se pueden utilizar para la inmunofenotipificación de líneas celulares y muestras biológicas. Las proteínas Terapéuticas de la presente invención pueden ser útiles como marcadores específicos de células, o más específicamente como marcadores celulares que se expresan diferencialmente en diversas fases de diferenciación y/o maduración de tipos concretos de células. Los anticuerpos monoclonales (o proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica) dirigidos contra un epítipo específico, o combinación de epítopos, permitirán el escrutinio de poblaciones celulares que expresan el marcador. Se pueden utilizar diversas técnicas que emplean anticuerpos monoclonales (o proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica) para escrutar las poblaciones celulares que expresan el marcador o los marcadores, e incluyen separación magnética utilizando cuentas magnéticas recubiertas con anticuerpo, "purificación por inmunoprecipitación" con anticuerpo

anclado a una matriz sólida (esto es, placa), y citometría de flujo (Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos 5.985.660; y Morrison et al. Cell. 96:737-49 (1999)).

Estas técnicas permiten el escrutinio de poblaciones concretas de células, tales como las que se podrían encontrar con malignidades hematológicas (esto es, enfermedad residual mínima (ERM) en pacientes con leucemia aguda) y células "no propias en trasplantes para prevenir la enfermedad de Injerto contra a Anfritión (EICA). Alternativamente, estas técnicas permiten el escrutinio de células madre hematopoyéticas y progenitoras capaces de experimentar proliferación y/o diferenciación, como las que se podrían encontrar en sangre de cordón umbilical humano.

Caracterización de anticuerpos que se unen a una proteína terapéutica y proteínas de fusión de albúmina que comprenden un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína terapéutica

Los anticuerpos de la descripción o las proteínas de fusión de albúmina de la descripción que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica (o un fragmento o variante de la misma) se pueden caracterizar en una variedad de formas. En particular, las proteínas de fusión de albúmina de la invención que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica se pueden analizar para determinar la capacidad para unirse específicamente a los mismos antígenos unidos específicamente al anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica correspondiente al anticuerpo que se une a una porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina utilizando mecanismos descritos en la presente memoria o mecanismos de modificación rutinarios conocidos en la técnica.

Los análisis para determinar la capacidad de los anticuerpos de la descripción o las proteínas de fusión de albúmina de la descripción que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica (o un fragmento o variante de la misma) para unirse (específicamente) a una proteína o epítipo específicos se pueden realizar en solución (p. ej., Houghten, Biothechniques 13:412-421(1992)), sobre cuentas (p. ej., Lam, Nature 354:82-84 (1991)), sobre chips (p. ej., Fodor, Nature 364:555-556 (1993)), sobre bacterias (p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409), sobre esporas (p. ej., Patentes Núms. 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), sobre plásmidos (p. ej., Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869 (1992)) o sobre fagos (p. ej., Scott y Smith, Science 249:386-390 (1990); Devlin, Science 249:404-406 (1990); Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382 (1990); y Felici, J. Mol. Biol. 222:301-310 (1991)). Los anticuerpos de la descripción o las proteínas de fusión de albúmina de la descripción que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma) también pueden ser analizados para determinar su especificidad y afinidad por una proteína o epítipo específicos utilizando mecanismos de modificación rutinarios descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica.

Las proteínas de fusión de albúmina de la descripción que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica se pueden analizar para determinar la reactividad cruzada con otros antígenos (p. ej., moléculas que tienen conservación de la secuencia/estructura con las moléculas unidas específicamente al anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica (o un fragmento o variante de la misma) correspondiente a la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina de la invención) mediante cualquier método conocidos en la técnica.

Los inmunoanálisis que se pueden utilizar para analizar la unión (inmuno-específica) y la reactividad cruzada incluyen, pero no se limitan a, sistemas de análisis competitivos y no competitivos utilizando mecanismos tales como transferencias western, radioinmunoanálisis, ELISA (análisis de inmunoabsorción con enzima ligada), inmunoanálisis "sándwich", análisis de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, análisis de inmunodifusión, análisis de aglutinación, análisis de fijación del complemento, análisis inmunoradiométricos, inmunoanálisis fluorescentes, e inmunoanálisis de proteína A, por nombrar unos pocos. Tales análisis son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora como referencia a la presente memoria en su totalidad). Los inmunoanálisis ilustrativos se describen brevemente más abajo (pero no se pretende que sean limitantes).

Los protocolos de inmunoprecipitación comprenden generalmente la lisis de una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (NP-40 o Tritón X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, SDS al 0,1%, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2, Trasylol al 1%) con un suplemento de proteína fosfatasa y/o inhibidores de proteasa (p. ej., EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), la adición de un anticuerpo o proteína de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica (o un fragmento o variante de la misma) al producto lisado celular, la incubación durante un período de tiempo (p. ej., 1 a 4 horas) a 40 grados C, la adición de cuentas de sefrosa con proteína A y/o proteína G (o cuentas recubiertas con un anticuerpo anti-idiotípico o un anticuerpo anti-albúmina apropiado en el caso de una proteína de fusión de albúmina que comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo Terapéutico) al producto lisado celular, la incubación durante aproximadamente una hora o más a 40 grados C, el lavado de las cuentas en tampón de lisis y la resuspensión de las cuentas en SDS/tampón de muestra. La capacidad del anticuerpo o la proteína de fusión de albúmina para inmunoprecipitar un antígeno concreto se puede evaluar, p. ej., mediante análisis de transferencia western. Un experto en la técnica estaría informado de los parámetros que se

pueden modificar para incrementar la unión del anticuerpo o la proteína de fusión de albúmina a un antígeno y disminuir el fondo (*p. ej.*, pre-aclaramiento del producto lisado celular con cuentas de sefarosa). Para una discusión adicional con respecto a los protocolos de inmunoprecipitación véase, *p. ej.*, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.16.1.

- 5 El análisis de transferencia Western generalmente comprende la preparación de las muestras de proteínas, la electroforesis de las muestras de proteínas en un gel de poliacrilamida (*p. ej.*, SDS-PAGE al 8%-20% dependiendo del peso molecular del antígeno), la transferencia de la muestra de proteína del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, el bloqueo de la membrana en solución de bloqueo (*p. ej.*, PBS con BSA al 3% o leche desnatada), el lavado de la membrana en tampón de lavado (*p. ej.*, PBS-Tween 20), la aplicación del anticuerpo o la proteína de fusión de albúmina (diluida en tampón de bloqueo) a la membrana, el lavado de la membrana en tampón de lavado, la aplicación de un anticuerpo secundario (que reconoce la proteína de fusión de albúmina, *p. ej.*, un anticuerpo anti-albúmina de suero humana) conjugado con un sustrato enzimático (*p. ej.*, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o una molécula radiactiva (*p. ej.*, ^{32}P o ^{125}I) diluido en tampón de bloqueo, el lavado de la membrana en tampón de lavado, y la detección de la presencia del antígeno. Un experto en la técnica estaría informado de los parámetros que se pueden modificar para incrementar la señal detectada y reducir el ruido de fondo. Para una discusión adicional respecto a los protocolos de transferencia western véase, *p. ej.*, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 1Q8.1.

- 20 Los ELISA comprenden la preparación del antígeno, el recubrimiento de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, el lavado del antígeno que no se unió a los pocillos, la adición del anticuerpo o la proteína de fusión de albúmina (que comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica) conjugados con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (*p. ej.*, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) a los pocillos y la incubación durante un período de tiempo, el lavado de las proteínas de fusión de albúmina no unidas o unidas no específicamente, y la detección de la presencia del anticuerpo o las proteínas de fusión de albúmina específicamente unidas al antígeno que recubre el pocillo. En los ELISA el anticuerpo o la proteína de fusión de albúmina no tienen que ser conjugados a un compuesto detectable; en lugar de eso, se puede añadir al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo o la proteína de fusión de albúmina, respectivamente) conjugado con un compuesto detectable. Adicionalmente, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, se pueden aplicar el anticuerpo o la proteína de fusión de albúmina como recubrimiento al pocillo. En este caso, la molécula detectable podría ser el antígeno conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (*p. ej.*, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina). Un experto en la técnica estaría informado de los parámetros que se pueden modificar para incrementar la señal detectada así como de otras variaciones de los ELISA conocidas en la técnica. Para una discusión adicional referente a los ELISA véase, *p. ej.*, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1.

- La afinidad de unión de una proteína de fusión de albúmina a una proteína, antígeno, o epítipo y la velocidad de disociación de una interacción de anticuerpo- o proteína de fusión de albúmina- proteína/antígeno/epítipo se puede determinar mediante análisis de unión competitiva. Un ejemplo de un análisis de unión competitiva es un radioinmunoanálisis que comprende la incubación de un antígeno marcado (*p. ej.*, ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo o proteína de fusión de albúmina en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo o la proteína de fusión de albúmina por una proteína, antígeno, o epítipo específicos y las velocidades de disociación de pueden determinar a partir de los datos mediante análisis de gráficos de Scatchard. La competición con una segunda proteína que se une a la misma proteína, antígeno o epítipo que el anticuerpo o la proteína de fusión de albúmina, también se puede determinar utilizando radioinmunoanálisis. En este caso, la proteína, antígeno o epítipo se incuban con un anticuerpo o proteína de fusión de albúmina de la invención conjugados con un compuesto marcado (*p. ej.*, ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de una segunda proteína no marcada que se une a la misma proteína, antígeno, o epítipo que la proteína de fusión de albúmina de la invención.

- En una realización preferida, se utiliza un análisis cinético BIAcore para determinar las velocidades de asociación y disociación de la unión del anticuerpo o las proteínas de fusión de albúmina de la invención a una proteína, antígeno o epítipo. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y la disociación de anticuerpos, proteínas de fusión de albúmina, o polipéptidos, antígenos o epítopos específicos a partir de chips con polipéptidos, antígenos o epítopos específicos, anticuerpos o proteínas de fusión de albúmina inmovilizados, respectivamente, sobre su superficie.

55 **Usos terapéuticos**

- La presente invención está dirigida adicionalmente a terapias basadas en anticuerpos que implican la administración de anticuerpos o proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica a un paciente animal, preferiblemente un mamífero, y muy preferiblemente un ser humano, para el tratamiento de una o más de las enfermedades, trastornos, o afecciones descritos. Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos descritos en la presente memoria), ácido nucleicos que codifican

anticuerpos (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos y anticuerpos anti-idiotípicos descritos en la presente memoria), proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, y ácidos nucleicos que codifican tales proteínas de fusión de albúmina. Los anticuerpos o proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica se pueden utilizar para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la expresión y/o actividad aberrantes de una proteína Terapéutica, incluyendo, pero no limitadas a, una o más cualesquiera de las enfermedades, trastornos, o afecciones descritos en la presente memoria. El tratamiento y/o la prevención de enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la expresión y/o actividad aberrante de una proteína Terapéutica incluyen, pero no se limitan a, el alivio de los síntomas asociados con aquellas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos de la invención o proteínas de fusión de albúmina de la invención que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica pueden ser proporcionados en composiciones farmacéuticamente aceptables como es sabido en la técnica o como se describe en la presente memoria.

En una realización específica y preferida, la presente descripción está dirigida a terapias basadas en anticuerpos que implican la administración de anticuerpos o proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica a un paciente animal, preferiblemente un mamífero, y muy preferiblemente un ser humano, para el tratamiento de una o más enfermedades, trastornos, o afecciones, incluyendo pero no limitados a: trastornos neurales, trastornos del sistema inmunitario, trastornos musculares, trastornos reproductivos, trastornos gastrointestinales, trastornos pulmonares, trastornos cardiovasculares, trastornos renales, trastornos proliferativos, y/o enfermedades y afecciones cancerosas, y/o como se describe en otra parte en la presente memoria. Los compuestos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (p. ej., anticuerpos dirigidos a la proteína completa expresada sobre la superficie celular de una célula de mamífero; anticuerpos dirigidos a un epítipo de una proteína Terapéutica y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos y anticuerpos anti-idiotípicos como se describe en la presente memoria). Los anticuerpos se pueden utilizar para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociados con una expresión y/o actividad aberrante de una proteína Terapéutica, incluyendo, pero no limitados a, uno o más cualesquiera de las enfermedades, trastornos, o afecciones descritos en la presente memoria. El tratamiento y/o la prevención de enfermedades, trastornos, o afecciones asociados con la expresión y/o actividad aberrante de una proteína Terapéutica incluye, pero no se limita a, el alivio de los síntomas asociados con aquellas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos de la invención o las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica se pueden proporcionar en composiciones farmacéuticamente aceptables como es sabido en la técnica o como se describe en la presente memoria.

Un resumen de las maneras en las que los anticuerpos o proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica pueden ser utilizados terapéuticamente incluye la unión de proteínas Terapéuticas localmente o sistémicamente en el organismo o mediante citotoxicidad directa del anticuerpo, p. ej., mediada por el complemento (CDC) o por células efectoras (CCDA). Algunos de estos enfoques se describen con más detalle a continuación. Con las ilustraciones proporcionadas en la presente memoria, un experto normal en la técnica sabrá cómo utilizar los anticuerpos de la invención o las proteínas de fusión de albúmina de la invención que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica con fines diagnósticos, de control o terapéuticos sin una experimentación indebida.

Los anticuerpos o proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica se pueden utilizar ventajosamente combinados con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfoquinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, p. ej., IL-2, IL-3 e IL-7), por ejemplo, que sirven para incrementar el número o la actividad de las células efectoras que interaccionan con los anticuerpos.

Los anticuerpos o las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica se pueden administrar solos o combinados con otros tipos de tratamientos (p. ej., terapia con radiación, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y agentes anti-tumorales). Generalmente, se prefiere la administración de productos de un origen de especie o una reactividad de especie (en el caso de los anticuerpos) que son de la misma especie que la del paciente. De este modo, en una realización preferida, se administran anticuerpos humanos, fragmentos, derivados, análogos, o ácidos nucleicos a un paciente humano para la terapia o profilaxis.

Se prefiere utilizar anticuerpos inhibidores y/o neutralizadores de alta afinidad y/o potentes *in vivo* contra proteínas Terapéuticas, fragmentos o regiones de los mismos, (o la proteína de fusión de albúmina correspondiente a semejante anticuerpo) tanto para inmunoanálisis dirigidos a, como para la terapia de trastornos relacionados con polinucleótidos o polipéptidos, incluyendo fragmentos de los mismos, de la presente invención. Tales anticuerpos, fragmentos, o regiones, tendrán preferiblemente afinidad por los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, incluyendo los fragmentos de los mismos. Las afinidades de unión preferidas incluyen constantes de disociación o K_d menores de 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M. Las afinidades de unión más preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d menor de 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M,

10^{-7} M, 5×10^{-8} M o 10^{-8} M. Las afinidades de unión incluso más preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o Kd menor de 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M.

Terapia génica

- 5 En una realización específica, se administran ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos que se unen a proteínas terapéuticas o proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno asociados con la expresión y/o actividad aberrante de una proteína Terapéutica, a modo de terapia génica. Terapia génica hace referencia a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un
- 10 ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que media un efecto terapéutico.

Se puede utilizar cualquiera de los métodos para la terapia génica disponibles en la técnica. Los métodos ilustrativos se describen con más detalle en otra parte en esta solicitud.

Demostración de la actividad terapéutica o profiláctica

- 15 Los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención se someten a ensayo preferiblemente *in vitro*, y a continuación *in vivo* para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su utilización en seres humanos. Por ejemplo, los análisis *in vitro* para demostrar la utilidad terapéutica o profiláctica de un compuesto o composición farmacéutica incluyen el efecto de un compuesto sobre una línea celular o una muestra de tejido de un paciente. El efecto del compuesto o la composición sobre la línea celular y/o la muestra de tejido se puede
- 20 determinar utilizando mecanismos conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, análisis de formación de rosetas y análisis de lisis celular. De acuerdo con la invención, los análisis *in vitro* que se pueden utilizar para determinar si la administración de un compuesto específico está indicada, incluyen análisis de cultivo celular *in vitro* en los que una muestra de tejido de un paciente se hace crecer en cultivo y se expone a o se administra de otro modo un compuesto, y se observa el efecto de semejante compuesto sobre la muestra de tejido.

Administración terapéutica/profiláctica y composición

- La descripción proporciona métodos de tratamiento, inhibición y profilaxis mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de la invención. En una realización preferida, el compuesto se purifica sustancialmente (p. ej., sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). El sujeto es preferiblemente un animal, incluyendo pero no limitado a animales
- 30 tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es preferiblemente un mamífero, y muy preferiblemente un ser humano.

Las formulaciones y los métodos de administración que se pueden emplear cuando el compuesto comprende un ácido nucleico o una inmunoglobulina se han descrito anteriormente; las formulaciones y las rutas de administración adicionales apropiadas se pueden seleccionar entre las descritas en la presente memoria más abajo.

- 35 Se conocen varios sistemas de liberación y se pueden utilizar para administrar un compuesto de la invención, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitos mediada por receptores (véase, p. ej., Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, las rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea,
- 40 intranasal, epidural, y oral. Los compuestos o composiciones se pueden administrar mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Adicionalmente, puede ser deseable introducir los compuestos farmacéuticos o las composiciones de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, incluyendo la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, anclado a un reservorio, tal como un reservorio Ommaya. También se pueden emplear la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización.

- En una realización específica, puede ser deseable administrar los compuestos farmacéuticos o las composiciones de la invención localmente a la zona que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, p. ej., junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferiblemente, cuando se administra una proteína, incluyendo un anticuerpo, de la
- 55 invención, se debe tener cuidado de utilizar materiales en los cuales no se absorba la proteína.

En otra realización, el compuesto o la composición se pueden liberar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249:1527- 1533 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and

Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, idem., págs. 317-327; véase en general idem.)

En otra realización más, el compuesto o la composición se pueden liberar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba (véase Langer, más arriba; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). En la realización controlada, se pueden utilizar materiales poliméricos (véanse Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); véanse también Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)). En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada en las proximidades de la diana terapéutica, p. ej., el cerebro, requiriendo de ese modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, más arriba, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).

Otros sistemas de liberación controlada se comentan en la revisión de Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

En una realización específica donde el compuesto es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión del ácido nucleico apropiado y administrándolo de manera que se convierta en intracelular, p. ej., mediante la utilización de un vector retroviral (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo con micropartículas (p. ej., una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en conexión con un péptido de tipo homeobox que se sabe que penetra en el núcleo (véase p. ej., Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991)), etc. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico intracelularmente e incorporarlo dentro del ADN de la célula anfitriona para su expresión, mediante recombinación homóloga.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" representa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más concretamente en seres humanos. El término "portador" hace referencia a un diluyente, coadyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los que tienen su origen en el petróleo, o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es el portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa acuosa y glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, concretamente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionante, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular en forma de supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador con el fin de proporcionar la forma de administración apropiada para el paciente. La formulación se debe adaptar al modo de administración.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o un producto concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectables o solución salina de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.

Los compuestos de la invención se pueden formular en forma neutra o de sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio,

hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

La cantidad del compuesto de la invención que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociados con la expresión y/o actividad aberrante de una proteína Terapéutica se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Adicionalmente, se puede emplear análisis in vitro para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se vaya a emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se debe decidir de acuerdo con el criterio del médico a cargo y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo in vitro o en modelos animales.

Para los anticuerpos, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente se encuentra entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, más preferiblemente de 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una vida media más larga en el organismo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos foráneos. De este modo, a menudo es posible una dosificación inferior de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Adicionalmente, la dosificación y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención se puede reducir potenciando la absorción y la penetración en el tejido (p. ej., en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, la lipidación.

Diagnóstico y formación de imágenes

Los anticuerpos marcados y los derivados y análogos de los mismos que se unen a una proteína Terapéutica (o un fragmento o variante de la misma) (incluyendo proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica), se pueden utilizar con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar, o controlar enfermedades, trastornos, y/o afecciones asociados con la expresión y/o actividad aberrante de una proteína Terapéutica. La invención proporciona la detección de la expresión aberrante de una proteína Terapéutica, que comprende (a) analizar la expresión de la proteína Terapéutica en células o fluido corporal de un individuo utilizando uno o más anticuerpos específicos para el polipéptido de interés y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica patrón, por medio de lo cual un aumento o una disminución del nivel de expresión de la proteína Terapéutica analizada comparados con el nivel de expresión patrón son indicativos de una expresión aberrante.

La invención proporciona un análisis de diagnóstico para diagnosticar un trastorno, que comprende (a) analizar la expresión de la proteína Terapéutica en células o fluido corporal de un individuo utilizando uno o más anticuerpos específicos para la proteína Terapéutica o proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo específico para una proteína Terapéutica, y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica convencional, por medio de lo cual un aumento o una disminución del nivel de expresión de la proteína Terapéutica analizado en comparación con el nivel de expresión convencional son indicativos de un trastorno concreto. Con respecto al cáncer, la presencia de una cantidad relativamente elevada de transcrito en el tejido sometido a biopsia de un individuo puede indicar una predisposición al desarrollo de la enfermedad, o puede proporcionar un método para detectar la enfermedad antes de la aparición de los síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir a los profesionales de la salud el empleo de medidas preventivas o de un tratamiento agresivo más temprano, evitando de ese modo el desarrollo o el progreso adicional del cáncer.

Los anticuerpos o las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo específico para una proteína Terapéutica se pueden utilizar para analizar los niveles de proteína en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistoquímicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., véanse Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para la detección de la expresión génica de la proteína incluyen inmunoanálisis, tales como el análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) y el radioinmunoanálisis (RIA). Las marcas adecuadas para el análisis de anticuerpos son conocidas en la técnica e incluyen marcas enzimáticas, tales como glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (¹²⁵I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹²In), y tecnecio (⁹⁹Tc); marcas luminiscentes, tales como luminol; y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Una faceta de la descripción es la detección y el diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociados con la expresión aberrante de una proteína Terapéutica en un animal, preferiblemente un mamífero y muy preferiblemente un ser humano. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, parenteralmente, subcutáneamente, o intraperitonealmente) a un sujeto una cantidad eficaz de una molécula marcada que se une específicamente al polipéptido de interés; b) esperar un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en sitios del sujeto en los que se expresa la proteína Terapéutica (y para que la molécula marcada no unida sea aclarada a nivel del fondo); c) determinar el nivel de fondo; y d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de manera que la detección de la molécula marcada por encima del nivel de fondo indica que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno concretos asociados con la expresión aberrante de la proteína terapéutica. El nivel de fondo se puede determinar mediante diversos métodos

incluyendo la comparación de la cantidad de molécula marcada detectada con un valor patrón previamente determinado para un sistema concreto.

Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de formación de imágenes utilizado determinarán la cantidad necesaria de radical formador de imágenes para producir las imágenes de diagnóstico. En el caso de un radical radioisotópico, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada oscilará normalmente de aproximadamente 5 a 20 milicurios de ^{99m}Tc . El anticuerpo, el fragmento de anticuerpo, o la proteína de fusión de albúmina que comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica marcados se acumularán preferentemente en la localización de las células que contiene la proteína Terapéutica específica. La formación de imágenes de un tumor *in vivo* es descrita por S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments". (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)).

Dependiendo de diversas variables, incluyendo el tipo de marca utilizada y el modo de administración, el intervalo de tiempo después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en los sitios del sujeto y la molécula marcada no unida se aclare al nivel del fondo es de 6 a 48 horas o 6 a 24 horas o 6 a 12 horas. En otra realización, el intervalo de tiempo después de la administración es de 5 a 20 días o 5 a 10 días.

En una realización, el control de la enfermedad o trastorno se lleva a cabo repitiendo el método para diagnosticar la enfermedad o trastorno, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

La presencia de la molécula marcada se puede detectar en un paciente utilizando métodos conocidos en la técnica para el barrido *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marca utilizada. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar el método apropiado para detectar una marca concreta. Los métodos y dispositivos que se pueden utilizar en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, pero no se limitan a, tomografía computarizada (CT), barrido de todo el organismo tal como la tomografía de emisión de positrones (PET), la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), y la sonografía.

En una realización específica, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente utilizando un aparato quirúrgico sensible a la radiación (Thurston et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.441.050). En otra realización, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente utilizando un aparato de barrido sensible a la fluorescencia. En otra realización, la molécula se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente utilizando la tomografía de emisión de positrones. En otra realización más, la molécula se marca con una marca paramagnética y se detecta en un paciente utilizando la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). Los anticuerpos que detectan específicamente la proteína de fusión de albúmina pero no la albúmina o la proteína terapéutica sola son una realización preferida. Estos se pueden utilizar para detectar la proteína de fusión de albúmina descrita en toda esta memoria descriptiva.

Kits

La presente invención proporciona kits que se pueden utilizar en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo purificado, en uno o más recipientes. En una realización específica, los kits contienen un polipéptido sustancialmente aislado que comprende un epítipo que es específicamente inmunorreactivo con un anticuerpo incluido en el kit. Preferiblemente, los kits de la presente invención comprenden adicionalmente un anticuerpo de control que no reacciona con el polipéptido de interés. En otra realización específica, los kits de la presente invención contienen un medio para detectar la unión de un anticuerpo a un polipéptido de interés (p. ej., el anticuerpo puede estar conjugado con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente, o un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo que puede estar conjugado con un sustrato detectable).

En otra realización específica de la presente invención, el kit es un kit de diagnóstico para su uso en el escrutinio de suero que contiene anticuerpos específicos contra polinucleótidos y polipéptidos proliferativos y/o cancerosos. Semejante kit puede incluir un anticuerpo de control que no reacciona con el polipéptido de interés. Semejante kit puede incluir un antígeno polipeptídico sustancialmente aislado que comprende un epítipo que es específicamente inmunorreactivo con al menos un anticuerpo anti-antígeno polipeptídico. Adicionalmente, semejante kit incluye un medio para detectar la unión de dicho anticuerpo al antígeno (p. ej., el anticuerpo se puede conjugar con un compuesto fluorescente tal como fluoresceína o rodamina que se puede detectar mediante citometría de flujo). En realizaciones específicas, el kit puede incluir un antígeno polipeptídico producido recombinantemente o sintetizado químicamente. El antígeno polipeptídico del kit también puede ser anclado a un soporte sólido.

En una realización más específica el medio de detección del kit anteriormente descrito incluye un soporte sólido al cual está anclado dicho antígeno polipeptídico. Semejante kit también incluye un anti-anticuerpo humano marcado con indicador no anclado. En esta realización, la unión del anticuerpo al antígeno polipeptídico se puede detectar mediante la unión del anticuerpo marcado con el indicador mencionado.

En una realización adicional, la invención incluye un kit de diagnóstico para su uso en el escrutinio de suero que contiene antígenos del polipéptido de la invención. El kit de diagnóstico incluye un anticuerpo sustancialmente

aislado específicamente inmunorreactivo con antígenos polipeptídicos o polinucleotídicos, y medios para detectar la unión del antígeno polipeptídico o polinucleotídico al anticuerpo. En una realización, el anticuerpo está anclado a un soporte sólido. En una realización específica, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. Los medios de detección del kit pueden incluir un segundo anticuerpo monoclonal marcado. Alternativamente, o adicionalmente, los

medios de detección pueden incluir un antígeno competitivo marcado.

En una configuración de diagnóstico, el suero de ensayo se hace reaccionar con un reactivo en fase sólida que tiene un antígeno unido a la superficie obtenido mediante los métodos de la presente invención. Después de la unión con el anticuerpo específico del antígeno al reactivo y la eliminación de los componentes del suero no unidos mediante lavado, el reactivo se hace reaccionar con anti-anticuerpo humano marcado con indicador para unir el indicador al reactivo en proporción a la cantidad de anticuerpo anti-antígeno unido sobre el soporte sólido. El reactivo se lava de nuevo para eliminar el anticuerpo marcado no unido, y se determina la cantidad de indicador asociado con el reactivo. Típicamente, el indicador es una enzima que se detecta incubando la fase sólida en presencia de un sustrato fluorométrico, luminiscente o colorimétrico adecuados (Sigma, St. Louis, MO).

El reactivo en superficie sólida del análisis anterior se prepara mediante mecanismos conocidos para el anclaje de material proteico a material de soporte sólido, tal como cuentas poliméricas, varillas medidoras, placas de 96 pocillos o material de filtro. Estos métodos de anclaje incluyen generalmente la adsorción no específica de la proteína al soporte o el anclaje covalente de la proteína, típicamente a través de un grupo amino libre, a un grupo químicamente reactivo sobre el soporte sólido, tal como un grupo carboxilo, hidroxilo o aldehído activados. Alternativamente, se puede utilizar placas recubiertas con estreptavidina junto con uno o varios antígenos biotinilados.

De este modo, la invención proporciona un sistema de análisis o kit para llevar a cabo este método de diagnóstico. El kit incluye generalmente un soporte con antígenos recombinantes unidos a la superficie, y un anti-anticuerpo humano marcado con indicador para la detección de anticuerpo anti-antígeno unido a la superficie.

Proteínas de fusión de albúmina

La presente invención se refiere en general a proteínas de fusión de albúmina y métodos de tratamiento, prevención, o alivio de enfermedades o trastornos. Según se utiliza en la presente memoria, "proteína de fusión de albúmina" hace referencia a una proteína formada por la fusión de al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o variante de la misma) a al menos dos moléculas de la proteína Terapéutica (o un fragmento o variante de la misma). Una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos un fragmento o variante de la proteína Terapéutica y al menos un fragmento o variante de albúmina de suero humano, que están asociados entre sí, preferiblemente mediante fusión genética (es decir, la proteína de fusión de albúmina se genera mediante traducción de un ácido nucleico en el que un polinucleótido que codifica toda o una porción de una proteína Terapéutica está unido en marco con un polinucleótido que codifica toda o una porción de la albúmina) o entre sí. La proteína Terapéutica y la proteína de albúmina, una vez que son parte de la proteína de fusión de albúmina, pueden ser referidas, cada una, como "porción", "región" o "radical" de la proteína de fusión de albúmina.

En una realización preferida, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o constructo de fusión de albúmina descrito en la Tabla 1 o la Tabla 2. Los polinucleótidos que codifican estas proteínas de fusión de albúmina también están incluidos en la invención.

Las proteínas de fusión de albúmina preferidas de la invención, incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión de albúmina codificadas por una molécula de ácido nucleico que comprende, o alternativamente consiste en, un polinucleótido que codifica al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o variante de la misma) unida en marco a al menos un polinucleótido que codifica al menos una molécula de una proteína terapéutica (o un fragmento o una de la misma); una molécula de ácido nucleico que comprende, o alternativamente consiste en, un polinucleótido que codifica al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o variante de la misma) unida en marco a al menos un polinucleótido que codifica al menos una molécula de una proteína terapéutica (o un fragmento o variante de la misma) generada como se describe en la Tabla 1, Tabla 2 o en los Ejemplos; o una molécula de ácido nucleico que comprende, o alternativamente consiste en, un polinucleótido que codifica al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o variante de la misma) unida en marco a al menos un polinucleótido que codifica al menos una molécula de una proteína terapéutica (o un fragmento o variante de la misma), que comprende adicionalmente, por ejemplo, uno o más de los siguientes elementos: (1) un vector auto-replicante funcional (incluyendo pero no limitado a, un vector lanzadera, un vector de expresión, un vector de integración, y/o un sistema de replicación), (2) una región para el inicio de la transcripción (p. ej., una región promotora, tal como por ejemplo, un promotor inducible o regulable, un promotor constitutivo), (3) una región para la terminación de la transcripción, (4) una secuencia líder, y (5) un marcador seleccionable.

En una realización, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o alternativamente consiste en, la proteína Terapéutica (p. ej., como se describe en la Tabla 1) y una proteína de albúmina del suero. En otras realizaciones, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o alternativamente consiste en, un fragmento biológicamente activo y/o terapéuticamente activo de la proteína Terapéutica y una proteína de albúmina del suero. En otras realizaciones, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o alternativamente consiste en, a una variante biológicamente activa y/o

terapéuticamente activa de la proteína Terapéutica y una proteína de albúmina del suero. En realizaciones preferidas, el componente de proteína de albúmina del suero de la proteína de fusión de albúmina es la porción madura de la albúmina del suero.

5 En realizaciones adicionales, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o alternativamente consiste en, la proteína Terapéutica, y un fragmento biológicamente activo y/o terapéuticamente activo de albúmina del suero. En realizaciones adicionales, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o alternativamente consiste en, la proteína Terapéutica y una variante biológicamente activa y/o terapéuticamente de albúmina del suero. En realizaciones preferidas, la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina es la porción madura de la proteína Terapéutica.

10 En realizaciones adicionales, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o alternativamente consiste en, un fragmento o variante biológicamente activos y/o terapéuticamente activos de la proteína Terapéutica y un fragmento o variante biológicamente activos y/o terapéuticamente activos de albúmina del suero. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o alternativamente consiste en, la porción madura de una proteína Terapéutica y la porción madura de albúmina del suero.

Preferiblemente, la proteína de fusión de albúmina comprende HA como porción N-terminal, y una proteína Terapéutica como porción C-terminal. Alternativamente, también se puede utilizar una proteína de fusión de albúmina que comprende HA como porción C-terminal, y una proteína Terapéutica como porción N-terminal.

20 En otras realizaciones, la proteína de fusión de albúmina tiene una proteína Terapéutica fusionada tanto al extremo N como al extremo C de la albúmina. En una realización preferida, las proteínas Terapéuticas fusionadas a los extremos N y C son las mismas proteínas Terapéuticas. En una realización alternativa preferida, las proteínas Terapéuticas fusionadas a los extremos N y C son proteínas Terapéuticas diferentes. En otra realización preferida, las proteínas Terapéuticas fusionadas a los extremos N y C son proteínas Terapéuticas diferentes que se pueden utilizar para tratar o prevenir la misma enfermedad, trastorno, o afección o una enfermedad, trastorno, o afección relacionados (p. ej., como los enumerados en la columna "Indicación preferida Y" de la Tabla 1). En otra realización preferida, las proteínas Terapéuticas fusionadas a los extremos N y C son proteínas Terapéuticas diferentes que se pueden utilizar para tratar, aliviar, o prevenir enfermedades o trastornos (p. ej., como los enumerados en la columna "Indicación preferida Y" de la Tabla 1) que se sabe en la técnica que ocurren comúnmente en los pacientes de manera simultánea, coincidente, o consecutiva, o que ocurren comúnmente en los pacientes asociados con otros.

30 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen proteínas que contienen dos, tres, cuatro o más moléculas de una proteína Terapéutica X dada o una variante de la misma fusionada al extremo N o C de una proteína de fusión de albúmina de la invención, y/o al extremo N y/o C de la albúmina o una variante de la misma. Las moléculas de una proteína Terapéutica X dada o variantes de la misma pueden estar en cualquiera de numerosas orientaciones, incluyendo, pero no limitadas a, una orientación 'cabeza a cabeza' (p. ej., en donde el extremo N de una molécula de una proteína Terapéutica X está fusionado al extremo N de otra molécula de la proteína Terapéutica X), o una orientación 'cabeza a cola' (p. ej., en donde el extremo C de una molécula de una proteína Terapéutica X está fusionado al extremo N de otra molécula de proteína Terapéutica X).

40 En una realización, dos, tres, o más polipéptidos de proteína Terapéutica X orientados en tándem (o fragmentos o variantes de los mismos) se fusionan al extremo N o C de una proteína de fusión de albúmina de la invención, y/o al extremo N o C de la albúmina o una variante de la misma.

45 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención abarcan adicionalmente proteínas que contienen dos, tres, cuatro, o más moléculas de una proteína Terapéutica X dada o una variante de la misma fusionadas al extremo N o C de una proteína de fusión de albúmina de la invención, y/o al extremo N y/o C de la albúmina o una variante de la misma, en donde las moléculas se unen a través de conectores peptídicos. Los ejemplos incluyen aquellos conectores peptídicos descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.073.627 (incorporada a la presente como referencia). Las proteínas de fusión de albúmina que comprenden múltiples polipéptidos de proteína Terapéutica X separados por conectores peptídicos se pueden producir utilizando la tecnología de ADN recombinante convencional. Los conectores son particularmente importantes cuando fusionan un péptido pequeño a la molécula de HSA grande. El propio péptido puede ser un conector al fusionar copias en tándem del péptido o se pueden utilizar otros conectores conocidos. Los constructos que incorporan conectores se describen en la Tabla 2 o resultan evidentes cuando se examina el SEQ ID NO: Y.

55 Adicionalmente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden ser producidas fusionando una proteína Terapéutica X o variantes de la misma al extremo N-terminal y/o C-terminal de la albúmina o variantes de la misma de tal manera que se permita la formación de formas multiméricas intramoleculares y/o intermoleculares. En una realización de la invención, las proteínas de fusión de albúmina pueden estar en formas monoméricas o multiméricas (es decir, dímeros, trímeros, tetrámeros y multímeros superiores). En una realización adicional de la invención, la porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina puede estar en forma monomérica o en forma multimérica (es decir, dímeros, trímeros, tetrámeros y multímeros superiores). En una realización específica, la porción de proteína Terapéutica de una proteína de fusión de albúmina está en forma

multimérica (es decir, dímeros, trímeros, tetrámeros y multímeros superiores), y la porción de proteína de albúmina está en forma monomérica.

Además de la proteína de fusión de albúmina en la cual la porción de albúmina está fusionada en posición N-terminal y/o C-terminal de la porción de proteína Terapéutica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden ser producidas insertando la proteína Terapéutica o péptido de interés (p. ej., una proteína Terapéutica X como se describe en la Tabla 1, o un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica o un fragmento o variante de la misma) en una región interna de HA. Por ejemplo, dentro de la secuencia de proteína de la molécula de HA existen numerosos bucles o giros entre el extremo y el principio de las hélices α , que están estabilizados por enlaces disulfuro. Los bucles, como se determina a partir de la estructura cristalina de HA (identificadores PDB 1AO6, 1BJ5, 1BKE, 1BM0, 1E7E a 1E7I y 1UOR) para la mayor parte se extienden lejos del cuerpo de la molécula. Estos bucles son útiles para la inserción, o fusión interna, de los péptidos terapéuticamente activos, concretamente aquellos que requieren una estructura secundaria para ser funcionales, o proteínas Terapéuticas, para generar esencialmente una molécula de albúmina con una actividad biológica específica.

Los bucles de la estructura de la albúmina humana en los que se pueden insertar péptidos o polipéptidos para generar proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen: Val54-Asn61, Thr76-Asp89, Ala92-Glu100, Gln170-Ala176, His 247 - Glu252, Glu 266 - Glu277, Glu 280-His288, Ala362- Glu368, Lys439-Pro447, Val462-Lys475, Thr478-Pro486, y Lys560-Thr566. En realizaciones más preferidas, los péptidos o polipéptidos se insertan en los bucles Val54-Asn61, Gln170-Ala176, y/o Lys560-Thr566 de la albúmina humana madura (SEQ ID NO: 1).

Los péptidos que se van a insertar pueden derivar de bibliotecas de presentación en fagos o de péptidos sintéticos escrutadas para determinar la actividad biológica específica o a partir de las porciones activas de una molécula con la función deseada. Adicionalmente, se pueden generar bibliotecas de péptidos al azar dentro de bucles concretos o mediante inserciones de péptidos al azar en bucles concretos de la molécula de HA y en las que se representan todas las combinaciones posibles de aminoácidos.

Tales bibliotecas se podrían generar sobre HA o fragmentos de dominios de HA mediante uno de los siguientes métodos:

mutación de aminoácidos al azar dentro de uno o más bucles de péptidos de HA o fragmentos de dominios de HA. Un cualquiera, más de uno o todos los residuos dentro de un bucle podrían ser mutados de esta manera;

reemplazo de, o inserción en uno o más bucles de HA o fragmentos de dominios de HA (esto es, fusión interna) de uno o varios péptidos aleatorizados de longitud X_n (donde X es un aminoácido y n es el número de residuos;

fusiones de péptidos/proteínas N-, C- o N- y C-terminales además de (a) y/o (b).

La HA o un fragmento del dominio HA también se pueden volver multifuncionales injertando los péptidos derivados de diferentes escrutinios de diferentes bucles frente a diferentes dianas en la misma HA o fragmento del dominio HA.

En realizaciones preferidas, los péptidos insertados en un bucle de albúmina de suero humana son fragmentos de péptidos o variantes de péptidos de las proteínas Terapéuticas descritas en la Tabla 1. Más concretamente, la invención abarca proteínas de fusión de albúmina que comprenden fragmentos de péptidos o variantes de péptidos de al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, o al menos 40 aminoácidos de longitud insertados en un bucle de albúmina de suero humana. La invención también incluye proteínas de fusión de albúmina que comprenden fragmentos de péptidos o variantes de péptidos de al menos 7 al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, o al menos 40 aminoácidos fusionados al extremo N de la albúmina de suero humana. La invención también incluye proteínas de fusión de albúmina que comprenden fragmentos de péptidos o variantes de péptidos de al menos 7 al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, o al menos 40 aminoácidos fusionados al extremo C de la albúmina de suero humana. Por ejemplo, los péptidos cortos descritos en las Tablas 1 y 2 (p. ej., Y Terapéutica) se pueden insertar en los bucles de albúmina.

Generalmente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden tener una región derivada de HA y una región derivada de la proteína Terapéutica. Sin embargo, se pueden utilizar múltiples regiones de cada proteína para elaborar una proteína de fusión de albúmina de la invención. De un modo similar, se puede utilizar más de una proteína Terapéutica para elaborar una proteína de fusión de albúmina de la invención. Por ejemplo, se puede fusionar una proteína Terapéutica a ambos extremos N- y C-terminales de la HA. En semejante configuración, las porciones de proteína Terapéutica pueden ser moléculas de proteína Terapéutica iguales o diferentes. La estructura de las proteínas de fusión de albúmina bifuncionales puede estar representada como: X-HA-Y o Y-HA-X.

Por ejemplo, se puede preparar una fusión scFv-HA-IFN α -2b anti-BLyS™ para modular la respuesta inmunitaria a IFN α -2b mediante un scFv anti-BLyS™. Una alternativa es elaborar una dosis bi- (o incluso multi-) funcional de fusiones de HA p. ej., la fusión HA-IFN α -2b mezclada con la fusión scFv HA-anti-BLyS™ u otras fusiones de HA en diversas proporciones dependiendo de la función, la vida media, etc.

También se pueden preparar proteínas de fusión de albúmina bi- o multi-funcionales para dirigir la porción de proteína Terapéutica de una fusión a un órgano o un tipo de célula diana a través de la proteína o péptido en el extremo opuesto de HA.

Como alternativa a la fusión de moléculas terapéuticas conocidas, los péptidos se podrían obtener mediante escrutinio de bibliotecas construidas como fusiones a los extremos N-, C- o N- y C- de HA, o fragmentos del dominio de HA, típicamente de 6, 8, 12, 20 o 25 o X_n (donde X es un aminoácido (aa) y n es igual al número de residuos) aminoácidos al azar, y en las que están representadas todas las posibles combinaciones de aminoácidos. Una ventaja particular de este enfoque es que los péptidos se pueden seleccionar *in situ* sobre la molécula de HA y las propiedades del péptido por lo tanto serían seleccionadas, más que, potencialmente modificadas, como podría ser el caso para un péptido obtenido mediante cualquier otro método, siendo anclados después a HA.

Adicionalmente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden incluir un péptido conector entre las porciones fusionadas para proporcionar una mayor separación física entre los radicales y de ese modo maximizar la accesibilidad de la porción de proteína Terapéutica, por ejemplo, para la unión a su receptor cognado. El conector peptídico puede consistir en aminoácidos de manera que sea flexible o más rígido.

La secuencia conectora puede ser escindible por una proteasa o químicamente para producir el radical relacionado con la hormona del crecimiento. Preferiblemente, la proteasa es una producida naturalmente por el anfitrión, por ejemplo la proteasa *kex2* de *S. cerevisiae* o proteasas equivalentes.

Por lo tanto, como se ha descrito anteriormente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden tener la siguiente fórmula R1-L-R2; R2-L-R1; o R1-L-R2-L-R1, en donde R1 es al menos una proteína Terapéutica, secuencia peptídica o polipeptídica, y no necesariamente la misma proteína Terapéutica, L es un conector y R2 es una secuencia de albúmina de suero.

En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención que comprenden la proteína Terapéutica tienen una mayor estabilidad en plasma en comparación con la estabilidad en plasma de la misma proteína Terapéutica cuando no está fusionada con albúmina. La estabilidad en plasma se refiere típicamente al período de tiempo entre el momento en el que la proteína Terapéutica es administrada *in vivo* y portada en el torrente sanguíneo y el momento en el que la proteína terapéutica es degradada y aclarada del torrente sanguíneo, a un órgano, tal como el riñón o el hígado, que por último aclara la proteína Terapéutica del organismo. La estabilidad en plasma se calcula en términos de la vida media de la proteína Terapéutica en el torrente sanguíneo. La vida media de la proteína Terapéutica en el torrente sanguíneo se puede determinar fácilmente mediante análisis comunes conocidos en la técnica.

En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de Albúmina de la invención que comprenden una proteína Terapéutica tienen una vida útil prolongada en comparación con la vida útil de la misma proteína Terapéutica cuando no está fusionada a albúmina. La vida útil se refiere típicamente al período de tiempo a lo largo del cual la actividad terapéutica de una proteína Terapéutica en solución o en alguna otra formulación de almacenamiento, es estable sin una pérdida indebida de actividad terapéutica. Muchas de las proteínas Terapéuticas son muy lábiles en su estado no fusionado. Como se describe más abajo, la vida útil típica de estas proteínas Terapéuticas se prolonga notablemente tras la incorporación a la proteína de fusión de albúmina de la invención.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención con una vida útil "prolongada" o "ampliada" muestran una mayor actividad terapéutica con respecto al patrón que ha sido sometido a las mismas condiciones de almacenamiento y manipulación. El patrón puede ser la proteína Terapéutica completa no fusionada. Cuando una porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de albúmina es un análogo, una variante, o está alterada de otro modo o no incluye la secuencia completa para esa proteína, la prolongación de la actividad terapéutica se puede comparar alternativamente con la del equivalente no fusionado de ese análogo, variante, péptido alterado o secuencia incompleta. Como ejemplo, una proteína de fusión con albúmina de la invención puede conservar más de aproximadamente 100% de la actividad terapéutica, o más de aproximadamente 105%, 110%, 120%, 130%, 150% o 200% de la actividad terapéutica de un patrón cuando se somete a las mismas condiciones de almacenamiento y manipulación que el patrón cuando se comparan en un punto temporal dado.

La vida útil también se puede evaluar en términos de la actividad terapéutica que queda después del almacenamiento, normalizada para la actividad terapéutica cuando comenzó el almacenamiento. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención con una vida útil prolongada o extendida como se muestra por una actividad terapéutica prolongada o extendida pueden conservar más de aproximadamente 50% de la actividad terapéutica, aproximadamente 60%, 70%, 80%, o 90% o más de la actividad terapéutica de la proteína Terapéutica no fusionada equivalente cuando se somete a las mismas condiciones.

Expresión de proteínas de fusión

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser producidas como moléculas recombinantes mediante secreción a partir de levadura, un microorganismo tal como una bacteria, o una línea celular humana o animal. Preferiblemente, el polipéptido es secretado desde las células anfitrionas.

Una realización particular de la invención comprende un constructo de ADN que codifica una secuencia señal efectiva para dirigir la secreción en levadura, concretamente una secuencia señal derivada de levadura (especialmente una que sea homóloga para el anfitrión de levadura), y la molécula fusionada del primer aspecto de la invención, no habiendo pro-secuencia derivada de levadura entre el polipéptido señal y maduro.

- 5 La señal de invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* es un ejemplo preferido de una secuencia señal derivada de levadura.

No se contemplan los productos conjugados de la clase preparada por Poznansky et al., (FEBS Lett. 239:18 (1988)), en la que polipéptidos preparados por separado se unen mediante entrecruzamiento químico.

- 10 La presente invención también incluye una célula, preferiblemente una célula de levadura transformada para expresar una proteína de fusión de albúmina de la invención. Además de las propias células anfitrionas transformadas, la presente invención también contempla un cultivo de esas células, preferiblemente un cultivo monoclonal (homogéneo clónicamente), o un cultivo derivado de un cultivo monoclonal, en un medio nutriente. Si el polipéptido es secretado, el medio contendrá el polipéptido, con las células, o sin las células si han sido filtradas o centrifugadas. Se conocen y se pueden utilizar muchos sistemas de expresión, incluyendo bacterias (por ejemplo *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*, hongos filamentosos (por ejemplo *Aspergillus*), células vegetales, células animales y células de insectos.

- 20 Las cepas de levadura preferidas que se van a utilizar en la producción de proteínas de fusión de albúmina son D88, DXY1 y BXP10. D88 [*leu2-3, lev 2-122, can 1/, pra1, ubc4*] es un derivado de la cepa parental AH22his⁺ (también conocida como DB 1; véase, p. ej., Sleep et al. Biotechnology 8:42-46 (1990)). La cepa contiene una mutación *leu2* que permite la selección auxótrofa de plásmidos basados en el de 2 micras que contienen el gen LEU2 gene. D88 también muestra una des-represión de PRBI en exceso de glucosa. El promotor PRB I es controlado normalmente por dos puntos de verificación que controlan los niveles de glucosa y la fase de crecimiento. El promotor es activado en levadura de tipo salvaje tras el agotamiento de la glucosa y entra en fase estacionaria. La cepa D88 muestra la represión por glucosa pero mantiene la inducción tras la entrada en la fase estacionaria. El gen PRAI codifica una proteasa vacuolar de levadura, la endoproteasa A YscA, que está localizada en el RE. El gen UBC4 se encuentra en la ruta de ubiquitinación y está implicado en el direccionamiento de proteínas de vida corta y anormales para la degradación dependiente de ubiquitina. Se encontró que el aislamiento de esta mutación *ubc4* incrementaba el número de copias de un plásmido de expresión en la célula y causaba un mayor nivel de expresión de una proteína deseada expresada a partir del plásmido (véase, p. ej., la Publicación Internacional Núm. WO99/00504, incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad).

- 30 DXY1, un derivado de D88, tiene el siguiente genotipo: [*leu2-3, leu2-122, can1, pra1, ubc4, ura3::yap3*]. Además de las mutaciones aisladas en D88, esta cepa también tiene una modificación genética para inactivar la proteasa YAP3. Esta proteasa causa la escisión de la mayoría de los residuos di-básicos (RR, RK, KR, KK) pero también puede promover la escisión en residuos básicos individuales en las proteínas. El aislamiento de esta mutación *yap3* dio como resultado mayores niveles de producción de HSA completa (véanse, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.965.386 y Kerry-Williams et al., Yeast 14:161-169 (1998), incorporados a la presente memoria como referencia en su totalidad).

- 40 BXP10 tiene el siguiente genotipo: *leu2-3, leu2-122, can1, pra1, ubc4, ura3, yap3::URA3, lys2, hsp150::LYS2, pmt1::URA3*. Además de las mutaciones aisladas en DXY1, esta cepa también tiene una modificación genética para inactivar el gen PMT1 y el gen HSP150. El gen PMT1 es un miembro de la familia conservada evolutivamente de la proteína dolcil-fosfato-D-manosa O-manosiltransferasas (Pmts). La topología transmembrana de Pmt1p sugiere que ésta es una proteína integrante de membrana del retículo endoplásmico con un papel en la glicosilación ligada a O. Esta mutación sirve para reducir/eliminar la glicosilación unida a O de las fusiones de HSA (véase, p. ej., la Publicación Internacional Núm. WO00/44772, incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad).
- 45 Los estudios revelaron que la proteína Hsp150 es separada de manera ineficaz de la rHA mediante cromatografía de intercambio iónico. La mutación en el gen HSP150 elimina un contaminante potencial que se ha demostrado que es difícil de eliminar mediante las técnicas de purificación convencionales. Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.783.423, incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad.

- 50 La proteína deseada es producida de las maneras convencionales, por ejemplo a partir de una secuencia codificante insertada en el cromosoma anfitrión o en un plásmido libre. Las levaduras son transformadas con una secuencia codificante de la proteína deseada en cualquiera de las maneras habituales, por ejemplo electroporación. Los métodos de transformación de levadura mediante electroporación son descritos por Becker & Guarente (1990) Methods Enzymol. 194, 182.

- 55 Las células transformadas satisfactoriamente, es decir, las células que contienen un constructo de ADN de la presente invención, pueden ser identificadas mediante mecanismos bien conocidos. Por ejemplo, las células resultantes de la introducción de un constructo de expresión se pueden hacer crecer para producir el polipéptido deseado. Las células pueden ser cosechadas y lisadas y su contenido de ADN puede ser examinado para determinar la presencia del ADN utilizando un método tal como el descrito por Southern (1975) J. Mol Biol. 98, 503 o Berent et al. (1985) Biotech. 3, 208. Alternativamente, la presencia de la proteína en el sobrenadante se puede

detectar utilizando anticuerpos.

Los vectores plasmídicos de levadura útiles incluyen pRS403-406 y pRS413-416 y son asequibles generalmente de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos Integrativos de Levadura (Ylp) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, 7RP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos Centroméricos de Levadura (Ycp).

Los vectores preferidos para elaborar proteínas de fusión de albúmina para su expresión en levadura incluyen pPPC0005, pScCHSA, pScNHSA, y pC4:HSA que se describen con detalle en el Ejemplo 1. La Figura 2 muestra un mapa del plásmido pPPC0005 que se puede utilizar como vector base en el cual se pueden clonar los polinucleótidos que codifican las proteínas Terapéuticas para formar fusiones con HA. Contiene un promotor *PRB1* de *S. cerevisiae* (PRB1p), una secuencia líder de Fusión (FL), ADN que codifica HA (rHA) y una secuencia terminadora *ADH1* de *S. cerevisiae*. La secuencia de la secuencia líder de fusión consiste en los primeros 19 aminoácidos del péptido señal de la albúmina de suero humana (SEQ ID NO: 3) y los últimos cinco aminoácidos del promotor del factor de apareamiento alfa I (SLDKR, véase EP-A-387 319 que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad).

Los plásmidos, pPPC0005, pScCHSA, pScNHSA, y pC4:HSA se depositaron el 11 de Abril de 2001 en la Colección de Cultivos Tipo Americana, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 y se les asignaron los números de acceso ATCC PTA-3278, PTA-3276, PTA-3279, y PTA-3277, respectivamente. Otro vector útil para expresar una proteína de fusión de albúmina en levadura es el vector pSAC35 que es descrito por Sleep et al., BioTechnology 8:42 (1990) que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

Un promotor de levadura que se puede utilizar para expresar la proteína de fusión de albúmina es el promotor MET25. Véase, por ejemplo, Dominik Mumburg, Rolf Muller y Martin Funk. Nucleic Acids Research, 1994, Vol. 22, Núm. 25, págs. 5767-5768. El promotor Met25 tiene 383 bases de longitud (bases -382 a -1) y los genes expresados por este promotor también son conocidos como Met15, Met17, y YLR303W. Una realización preferida utiliza la secuencia de más abajo, donde, en el extremo 5' de la secuencia de más abajo, el sitio Not 1 utilizado en la clonación está subrayado y en el extremo 3', el codón de inicio ATG está subrayado:

CGCGCCGCGCGGATGCAAGGTTTCAATCCCTTAGCTCTCATTATTTTGTCTTTTCTCTTGAGGTCACATGATCGCAAAATGGCAAA
TGGCAGTGAAGCTGTCGATATTGGGGAAGTGGTGGTGGGCAATGACTAATTAAGTTAGTCAAGGCGCCATCCTCATGAAAAC
GTGTAACATAATAACCGAAGTGTGCAAAAGGTGGCACCTTGTCCAATTGAACACGCTCGATGAAAAAATAAGATATATAAGGTT
AAGTAAAGCGTCTGTTAGAAAGGAAGTTTCTCTTTTCTGCTCTCTGCTTTTCTCTCTACTATTCTCTCGTGAATACAGGGTCGT
CAGATACATAGATACAATTCTATTACCCCATCCATACAATG (SEQ ID NO:5)

1. a) el promotor *cbh1*:

TCTAGAGTTGTGAAGTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTCGCATCTAAATACTCCGAAGCTGCTGCGAACCCGGA
GAATCGAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAATTAGCATGAAAGGCTATGAGAAATTCTGGAGACGGCTTGT
TGAATCATGGCGTTCCATTCTTCGACAAGCAAAAGCGTTCCGTCGCAGTAGCAGGCACTCATTCCCGAAAAAAGCTCGGAGA
TTCTTAAGTAGCGATGGAACCGGAATAATATAATAGGCAATACATTGAGTTGCCTCGACGGTTGCAATGCAGGGGTA

AGCTTGGACAIACTGTTCCGTACCCACCTCTTCTCAACCTTTGGCGTTTCCCTGATTGAGCGTACCCGTACAAGTCGTAA
TCACTATTAAACCCAGACTGACCGGACGTGTTTTGCCCTTCACTTTGGAGAAATAATGTCATTGCGATGTGTAATTTGCCTGCT
TGACCGACTGGGGCTGTTGCAAGCCGAATGTAGGATTGTTATCCGAACTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGT
CGGGCAGGACACGCTCGAAGGTTACGGCAAGGGAAACCCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAAGCCGCAA
TGCAGCATCACTGAAAAATACAAACCAATGGCTAAAAGTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAAGTCATATACGACGGCTAA
TAATTGTACAATCAAGTGCTAAACGTACCGTAATTTGCCAACGGCTGTGGGGTTGCAGAAGCAACGGCAAAAGCCCCAC
TTCCCAACGTTTGTCTTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGGTGATCCCCCAATTGGGTCGCTTGTGTTGTCGGGTGAAGTGA
AAGAAGACAGAGGTGAAGATGTCTGACTCGGAGCGTTTTCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAAATGTT
GACATTCAAGGAGTATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAGGAGGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACTGTAT
AGTCACTTCTGGTGAAGTGGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTGAGTTGAAACTGCCTAAG
ATCTCGGGCCCTCGGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTGTGCTCCGGGCAATGCAAAGTGTGGTAGGATCGAACAC
ACTGCTGCCTTACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAATGTTACAGGGGCCACTGCAATGGTTTCAATAGAAAGAG
AAGCTTAGCCAAGAACAATAGCCGATAAAGATAGCCTCATTAAACGGAATGAGCTAGTAGGCAAAAGTCAGCGAATGTGT
ATATATAAAGGTTTCGAGGTCCGTGCTCCCTCATGCTCTCCCCATCTACTCATCAACTCAGATCCTCCAGGAGACTTGTAC
ACCATCTTTTGAGGCACAGAAACCAATAGTCAACCGGCACTGGCATC (SEQ ID NO:113)

2. b) el promotor *cysD* de *Aspergillus nidulans*:

AGATCTGGTTCCTGAGTACATCTACCGATGCGCCTCGATCCCCCTCTTAGCCGCATGAGATTCCTACCATTTATGTCCTATCG
TTACAGGGTCTATTTGGACCGCTAGAAATAGACTCTGCTCGATTGTTTCCATTATTCAACCAATTACGATAGTATTTGGCTC
TTTTCTGTTTGGCCAGGTCAATTCGGGTAAGACGCGATCACGCCATTGTGGCCGCCGCGTGTGTGCTGCTATTCCCCGC
ATATAAACAACCCCTCCACCAAGTTCGTTGGGCTTTGCGAATGCTGTACTCTATTCAAGTTGTCAAAAGAGAGGATTCAAAA
AATTATACCCAGATATCAAAGATATCAAAGCCATC (SEQ ID NO:114)

3. c) un promotor cbh1 modificado que tiene la secuencia:
TCTAGAGTTGTGAAGTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTCGCATCTAAATACTCCGAAGCTGCTGCGAACCCGGA
GAATCGAGATGTGCTGGAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAATTAGCATGAAAGGCTATGAGAAATCTGGAGACGGCTTGT
TGAATCATGGCGTTCCATTCTTCGACAAGCAAAGCGTTCCGTCGAGTAGCAGGCACCTATTCCCGAAAAAATCGGAGA
TTCTTAAGTAGCGATGGAACCGGAATAATATAATAGGCAATACATTGAGTTGCCTCGACGGTTGCAATGCAGGGGTA
AGCTTGGACATAACTGTTCGGTACCCCACTCTTCTCAACCTTTGGCGTTTCCTGATTACGCGTACCCGTACAAGTCGTAA
TCACTATTAACCCAGACTGACCGGACGTGTTTGGCCCTCAATTGGAGAAAAATGTCATTGCGATGTGTAATTTGCCTGCT
TGACCGACTGGGGCTGTTTCGAAGCCCGAATGTAGGATTGTTATCCGAACCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGT
CGGGCAGGACACGCCCTCGAAGGTTACCGCAAGGGAAACACCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAAGCCGCAA
TGCAGCATCACTGGAAAAATACAAACCAATGGCTAAAAGTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAAGTCATATACCAGCGGTAA
TAATTGTACAATCAAGTGGCTAAACGTACCGTAATTTGCCAACGGCTTGTGGGGTTGCAGAGCAACGGCAAAAGCCCCAC
TCCCCACGTTTGTCTTCTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGGTGATCCCCCAATTGGGTGCTTGTGTTCGGTGAAGTGA
AAGAAGACAGAGGTAAAGATGTCTGACTCGGAGCGTTTGCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAATGTT
GACATTCAGAGGATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGTCTGCCGATACGACGAATCTGTAT
AGTCACTTCTGTGTGAAGTGGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTGAGTTGAAACTGCCTAAG
ATCTCGGGCCCTCGGGCTTTCGGCTTGGGTGTACATGTTGTGCTCCGGGCAAAAGTGTGGTAGGATCGAACAC
ACTGCTGCCTTTACCAAGCAGCTGAGGATGTGTATAGGCAAAATGTTACGGGGCCACTGCATGGTTTCGAATAGAAAGAG
AAGCTTAGCCTGCAGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTCGCTCGTGATTGTTTGCAAAAGAAACAAAAGTAAAAA
ACCCAGACACGCTCGACTTCCTGTCTTCTATTGATTGCAGCTTCCAATTCGTCACACAACAGGTCTAGCTTAGCCAA
GAACAATAGCCGATAAAGATAGCCTCATTAAACGGAATGAGCTAGTAGGCAAAAGTCAGCGAATGTGTATATAAAGGTT
CGAGGTCCGTGCTCCCTCATGCTCTCCCATCTACTCATCAACTCAGATCCTCCAGGAGACTTGTACACCATCTTTGAGG
CACAGAAACCAATAGTCAACCGGACTGGCATC (SEQ ID NO:115)

4. d) un promotor *cysD* de *Aspergillus nidulans* que tiene la secuencia:
AGATCTGGTTCCTGAGTACATCTACCGATGCGCTCGATCCCCCTTACCGCATGAGATTCTACCATTTATGCTCTATC
GTTACGGGTCTATTGGACCGCTAGAAATAGACTGTGCTCGATTGTTTCCATTATTCACGCAATTACGATAGTATTGGC
TCTTTTGTGTTGGCCAGGTCAATTCGGGTAAGACGCGATCACGCCATTGTGGCCGCCGCGCTGCAGCCTCTTATCGAGA
AAGAAATTACCGTCGCTCGTGATTGTTTGCAAAAAGAAACAAAAGTAAAAAACCCAGACACGCTCGACTTCTGTCTTCC
TATTGATTGCAGCTTCCAATTCGTCACACAACAAGTCTACGCCGGCGTTGTGCTGCTGCTATCCCCCGCATATAACA
ACCCCTCCACAGTTCGTTGGGCTTTGCGAATGCTGTACTCTATTTCAAGTTGTCAAAAGAGAGGATTCAAAAAATTATAC
CCCAGATATCAAAAGATATCAAAGCCATC (SEQ ID NO:116)

- 5 Se ha desarrollado una variedad de métodos para conectar operablemente ADN a vectores a través de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, se puede añadir tramos de homopolímeros complementarios al segmento de ADN que se va a insertar en el ADN del vector. El vector y el segmento de ADN se puede unir a continuación mediante puentes de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.
 - 10 Los conectores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción proporcionan un método alternativo de unión del segmento de ADN a vectores. El segmento de ADN, generado mediante digestión con endonucleasas de restricción, se trata con ADN polimerasa del bacteriófago T4 o ADN polimerasa I de *E. coli*, enzimas que eliminan los extremos de hebra sencilla gamma sobresalientes con sus actividades exonucleolíticas 3' 5', y rellenan los extremos 3' vaciados con sus actividades polimerizadoras.
 - 15 La combinación de estas actividades por lo tanto genera segmentos de ADN con extremos romos. Los segmentos con extremos romos se incuban a continuación con un gran exceso molar de moléculas conectoras en presencia de una enzima que es capaz de catalizar la ligación de moléculas de ADN con extremos romos, tal como la ADN ligasa de bacteriófago T4. De este modo, los productos de la reacción son segmentos de ADN que portan secuencias conectoras poliméricas en sus extremos. Estos segmentos de ADN se escinden a continuación con la enzima de restricción apropiada y se ligan a un vector de expresión que ha sido escindido con una enzima que produce
 - 20 extremos compatibles con los del segmento de ADN.
- Los conectores sintéticos que contienen una variedad de sitios para endonucleasas de restricción se encuentran disponibles en el mercado a partir de numerosas fuentes, incluyendo International Biotechnologies Inc, New Haven, CT, USA.
- 25 Un modo deseable de modificar el ADN de acuerdo con la invención, si, por ejemplo, se van a preparar variantes de HA, consiste en utilizar la reacción en cadena de la polimerasa como describen Saiki et al. (1988) Science 239, 487-491. En este método el ADN que se va a amplificar enzimáticamente se flanquea por dos cebadores oligonucleotídicos específicos que se incorporan a su vez al ADN amplificado. Los cebadores específicos pueden contener sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción que se pueden utilizar para la clonación en
 - 30 vectores de expresión utilizando métodos conocidos en la técnica.

Los géneros ilustrativos de levadura que se contempla que son útiles en la práctica de la presente invención como anfitriones para expresar las proteínas de fusión de albúmina son *Pichia* (Hansenula), *Saccharomyces*.

Kluyveromyces, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*, *Debaromyces*, *Metschnikowia*, *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Botryosaccharum*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis*, y similares. Los géneros preferidos son aquellos seleccionados del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Torulaspora*. Los ejemplos de *Saccharomyces* spp. son *S. cerevisiae*, *S. italicus* y *S. rouxii*.

- 5 Los ejemplos de *Kluyveromyces* spp. son *K. fragilis*, *K. lactis* y *K. marxianus*. Una especie adecuada de *Torulaspora* es *T. delbrueckii*. Los ejemplos de *Pichia* (*Hansenula*) spp. son *P. angusta* (antes *H. polymorpha*), *P. anomala* (antes *H. anomala*) y *P. pastoris*. Los métodos para la transformación de *S. cerevisiae* se ilustran en general en los documentos EP 251 744, EP 258 067 y WO 90/01063, todos los cuales se incorporan a la presente memoria como referencia.
- 10 Las especies ilustrativas preferidas de *Saccharomyces* incluyen *S. cerevisiae*, *S. italicus*, *S. diastaticus*, y *Zygosaccharomyces rouxii*. Las especies ilustrativas preferidas de *Kluyveromyces* incluyen *K. fragilis* y *K. lactis*. Las especies ilustrativas preferidas de *Hansenula* incluyen *H. polymorpha* (ahora *Pichia angusta*), *H. anomala* (ahora *Pichia anomala*), y *Pichia capsulata*. Las especies ilustrativas preferidas adicionales de *Pichia* incluyen *P. pastoris*. Las especies ilustrativas preferidas de *Aspergillus* incluyen *A. niger* y *A. nidulans*. Las especies ilustrativas preferidas de *Yarrowia* incluyen *Y. lipolytica*. Muchas especies de levadura preferidas se encuentran disponibles en la ATCC.
- 15 Por ejemplo, las siguientes especies de levadura preferidas se encuentran disponibles en la ATCC y son útiles en la expresión de proteínas de fusión de albúmina: *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, cepa teleomorfa BY4743 yap3 mutante (Núm. Acceso ATCC 4022731); *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, cepa teleomorfa BY4743 hsp150 mutante (Núm. Acceso ATCC 4021266); *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, cepa teleomorfa BY4743 pmt1 mutante (Núm. Acceso ATCC 4023792); *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorfa (Núms. Acceso ATCC 20626; 44773; 44774; y 62995); *Saccharomyces diastaticus* Andrews et Gilliland ex van der Walt, teleomorfa (Núm. Acceso ATCC 62987); *Kluyveromyces lactis* (Dombrowski) van der Walt, teleomorfa (Núm. Acceso ATCC 76492); *Pichia angusta* (Teunisson et al.) Kurtzman, teleomorfa depositada como *Hansenula* polimorfa de Morais et Maia, teleomorfa (Núm. Acceso ATCC 26012); *Aspergillus niger* van Tieghem, anamorfa (Núm. Acceso ATCC 9029); *Aspergillus niger* van Tieghem, anamorfa (Núm. Acceso ATCC 16404); *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, anamorfa (Núm. Acceso ATCC 48756); y *Yarrowia lipolytica* (Wickerham et al.) van der Walt et von Arx, teleomorfa (Núm. Acceso ATCC 201847).

- Los promotores adecuados para *S. cerevisiae* incluyen aquellos asociados con el gen PGK1, los genes GAL1 o GAL10, CYC1, PHO5, TRP1, ADH1, ADH2, los genes para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, triosa fosfatasa isomerasa, fosfoglucoasa isomerasa, glucoquinasa, feromona de factor de apareamiento alfa, [feromona de factor de apareamiento a], el promotor PRB1, el promotor GUT2, el promotor GPD1, y los promotores híbridos que implican híbridos de partes de las regiones reguladoras 5' con partes de regiones reguladoras 5' de otros promotores o con sitios de activación aguas arriba (p. ej., el promotor del documento EP-A-258 067).
- 30

- 35 Los promotores regulables convenientes para su uso en *Schizosaccharomyces pombe* son el promotor represible por tiamina del gen nmt descrito por Maundrell (1990) J. Biol. Chem. 265, 10857-10864 y el promotor del gen jbp1 reprimible por glucosa descrito por Hoffman & Winston (1990) Genetics 124, 807-816.

- Los métodos de transformación de *Pichia* para la expresión de genes foráneos son ilustrados, por ejemplo, por Cregg et al. (1993), y diversas patentes de Phillips (p. ej., US 4 857 467, incorporada a la presente memoria como referencia), y los kits de expresión de *Pichia* se encuentran disponibles en el mercado de Invitrogen BV, Leek, Netherlands, e Invitrogen Corp., San Diego, California. Los promotores adecuados incluyen AOX1 y AOX2. Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132, 3459-3465 incluyen información sobre vectores y transformación de *Hansenula*, siendo los promotores adecuados MOX1 y FMD1; mientras el documento EP 361 991, Fleer et al. (1991) y otras publicaciones de Rhone-Poulenc Rorer ilustran cómo expresar proteínas foráneas en *Kluyveromyces* spp., siendo un promotor adecuado PGK1.
- 40
- 45

- La señal de terminación de la transcripción es preferiblemente la secuencia limítrofe 3' de un gen eucariótico que contiene señales apropiadas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Las secuencias limítrofes 3' adecuadas pueden ser, por ejemplo, las del gen naturalmente ligado a la secuencia de control de la expresión utilizada, esto es, pueden corresponder al promotor. Alternativamente, pueden ser diferentes en cuyo caso se prefiere la señal de terminación del gen ADHI de *S. cerevisiae*.
- 50

La proteína de fusión de albúmina deseada puede ser expresada inicialmente con una secuencia líder de secreción, que puede ser cualquier líder eficaz en la levadura seleccionada. Los líderes útiles en levadura incluyen cualquiera de los siguientes:

- a) la secuencia señal MPIF-1 (p. ej., aminoácidos 1-21 de Núms. Acceso GenBank AAB51134) MKVSVAALSCLMLVTALGSQA (SEQ ID NO: 6)
- 55

b) la secuencia señal de stanniocalcina (MLQNSAVLLLLVISASA, SEQ ID NO: 7)

c) la región pre-pro de la secuencia señal de HSA (p. ej., MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR, SEQ ID NO: 8)

- d) la región pre de la secuencia señal de HSA (p. ej., MKWVTFISLLFLFSSAYS, SEQ ID NO: 9) o variantes de la misma, tales como, por ejemplo, MKWVSFISLLFLFSSAYS, (SEQ ID NO: 10)
- e) la secuencia señal de invertasa (p. ej., MLLQAFLFLLAGFAAKISA, SEQ ID NO: 11)
- f) la secuencia señal del factor de apareamiento alfa de levadura (p. ej.,
- 5 MRFPSIFTAV/LAFAAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGV SLEKR, SEQ ID NO: 12 o
- MRFPSIFTAV/LAFAAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGV SLDKR, SEQ ID NO: 12)
- g) la secuencia líder de la toxina asesina de *K. lactis*
- 10 h) una secuencia señal híbrida (p. ej., MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR, SEQ ID NO: 13)
- i) una secuencia señal híbrida HSA/MF α -1 (también conocida como HSA/kex2) (p. ej., MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR, SEQ ID NO: 14)
- j) una secuencia líder de la fusión asesina de *K. lactis*/MF α -1 (p. ej., MNIFYIFLFLSFVQGSLEDKR, SEQ ID NO: 15)
- k) la secuencia señal de Inmunoglobulina 1g (p. ej., MGWSCILFLVATATGVHS, SEQ ID NO: 16)
- 15 l) la secuencia señal del precursor de Fibulina B (p. ej., MERAAPSRRVPLPLLLGLLALLAAGVDA, SEQ ID NO: 17)
- m) la secuencia señal del precursor de clusterina (p. ej., MMKTLFLFVGLLLTWESGQVLG, SEQ ID NO: 18)
- n) la secuencia señal de la proteína 4 de unión a factor de crecimiento de tipo insulínico (p. ej., MLPLCLVAALLAAGPGPSLG, SEQ ID NO: 19)
- o) variantes de la región pre-pro de la secuencia señal de HSA tal como, por ejemplo,
- 20 MKWVSFISLLFLFSSAYSRGVFRR (SEQ ID NO: 20),
MKWVTFISLLFLFAGVLG (SEQ ID NO: 21),
MKWVTFISLLFLFSGVLG (SEQ ID NO: 22),
MKWVTFISLLFLFGGVLG (SEQ ID NO: 23),
Líder de HSA modificado HSA núm. 64 - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO: 24);
- 25 Líder de HSA modificado HSA núm. 66 - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO: 25);
Líder HSA modificado (A14) - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO: 26);
Líder de HSA modificado (S14) (también conocido como HSA núm. 65) - MKWVTFISLLFLFSGVSG (SEQ ID NO: 27),
- 30 Líder de HSA modificado (G14) - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO: 28), o MKWVTFISLLFLFSGVSG (SEQ ID NO: 29)
- p) una secuencia señal consenso (MPTWAWWLFLVLLLALWAPARG, SEQ ID NO: 30)
- q) líder de la fosfatasa ácida (PH05) (p. ej., MFKSVVYSILAASLANA SEQ ID NO: 31)
- r) la pre-secuencia de MFoz-1
- s) la pre-secuencia de glucanasa 0 (BGL2)
- 35 t) Líder de toxina asesina
- u) la presecuencia de toxina asesina
- v) prepro de la toxina asesina de *k. lactis* (29 aminoácidos; 16 aminoácidos de pre y 13 aminoácidos de pro) MNIFYIFLFLSFVQGLEHTRRGSLDKR (SEQ ID NO: 32)
- w) secuencia líder de secreción de glucoamilasa II de *S. diastaticus*
- 40 x) secuencia líder de secreción de α -galactosidasa (MEL1) de *S. carlsbergensis*
- y) secuencia líder de glucoamilasa de *Candida*
- z) Los líderes híbridos descritos en el documento EP-A-387 319 (incorporado a la presente memoria como referencia)
- aa) la secuencia señal de gp67 (junto con sistemas de expresión baculovirales) (p. ej., aminoácidos 1-19 de Número de Acceso GenBank AAA72759) o
- 45

bb) el líder natural de la proteína terapéutica X;

cc) el líder de invertasa de *S. cerevisiae* (SUC2), como se describe en el documento JP 62-096086 (concedida como 911036516, incorporada a la presente memoria como referencia); o

dd) Inulinasa - MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKR (SEQ ID NO: 33).

5 ee) Una variante núm. 1 del líder de propéptido TA57 modificado - MKLKTVRSAVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLISMAKR (SEQ ID NO: 34)

ff) Una variante núm. 2 del líder de propéptido TA57 modificado - MKLKTVRSAVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLISMAEEGEPKR (SEQ ID NO: 35)

10 gg) Un péptido señal consenso - MWWRLWWLLLLLLLLLWPMWWA (SEQ ID NO: 111)

hh) Una secuencia señal de HSA/kex2 modificada - MKWVSFISLLFLFSSAYSGLDKR (SEQ ID NO: 112)

ii) Un péptido señal consenso núm. 2 - MRPTWAWWLFLVLLLALWAPARG (SEQ ID NO: 105)

Métodos adicionales de producción recombinante y sintética de proteínas de fusión de albúmina

15 La presente invención también se refiere a vectores que contienen un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, a células anfitrionas, y a la producción de proteínas de fusión de albúmina mediante mecanismos sintéticos y recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de fago, plásmido, virus, o retrovirus. Los vectores retrovirales pueden ser de replicación competente o de replicación defectuosa. En el último caso, la propagación viral se producirá generalmente solo en células anfitrionas de complementación.

20 Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden unir a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un anfitrión. Generalmente, se introduce un vector plasmídico en un producto precipitado, tal como un producto precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, se puede empaquetar in vitro utilizando una línea celular de empaquetamiento apropiada y después se puede transducir a células anfitrionas.

25 El inserto de polinucleótido debe estar conectado operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores *lac*, *trp*, *phoA* y *tac* de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de las LTR retrovirales, por nombrar unos pocos. Otros promotores adecuados serán conocidos por el experto en la técnica. Los constructos de expresión contendrán adicionalmente sitios para el inicio de la transcripción, la terminación, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción
30 codificante de los transcritos expresados por los constructos incluirá preferiblemente un codón de inicio de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) situado apropiadamente al final del polipéptido que se vaya a traducir.

35 Como se indica, los vectores de expresión incluirán preferiblemente al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen los genes de la dihidrofolato reductasa, G418, glutamina sintasa, o de resistencia a neomicina para el cultivo de células eucarióticas, y de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de los anfitriones apropiados incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (Núm. Acceso ATCC 201178)); células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como células CHO, COS, NSO, 293, y de melanoma de Bowes; y células vegetales. Los medios de cultivo y las condiciones apropiados para las células anfitrionas descritas anteriormente son conocidos en la técnica.

Entre los vectores preferidos para su uso en bacterias se incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles en QIAGEN, Inc.; vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles en Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles en Pharmacia Biotech, Inc.
45 Entre los vectores eucarióticos preferidos se encuentran pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. Los vectores de expresión preferidos para su uso en sistemas de levadura incluyen, pero no se limitan a pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K, y PAO815 (todos disponibles de Invitrogen, Carlsbad, CA). Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

50 En una realización, los polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden fusionar a secuencias señal que dirigirán la localización de una proteína de la invención a compartimentos concretos de una célula procariótica o eucariótica y/o dirigirán la secreción de una proteína de la invención desde una célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, en *E. coli*, se puede desear dirigir la expresión de la proteína al espacio periplásmico. Los ejemplos de las secuencias señal o las proteínas (o fragmentos de las mismas) a las cuales se

- pueden fusionar las proteínas de fusión de albúmina de la invención con el fin de dirigir la expresión del polipéptido al espacio periplásmico de bacterias incluyen, pero no se limitan a, la secuencia señal *petB*, la secuencia señal de la proteína de unión a maltosa (MBP), MBP, la secuencia señal *ompA*, la secuencia señal de la subunidad B de la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* periplásmica, y la secuencia señal de la fosfatasa alcalina. Se encuentran disponibles diversos vectores para la construcción de proteínas de fusión que dirigirán la localización de una proteína, tales como la serie de vectores pMAL (concretamente la serie pMAL-p) asequible de New England Biolabs. En una realización específica, los polinucleótidos de las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden fusionar a la secuencia señal de la pectato liasa *pelB* para incrementar la eficacia de expresión y purificación de tales polipéptidos en bacterias Gram-negativas. Véanse, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.576.195 y 5.846.818, cuyos contenidos se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.
- Los ejemplos de los péptidos señal que se pueden fusionar a una proteína de fusión de albúmina de la invención con el fin de dirigir su secreción en células de mamífero incluyen, pero no se limitan a:
- a) la secuencia señal de MPIF-1 (p. ej., aminoácidos 1-21 del Núm. Acceso GenBank AAB51134) MKVSVAAALSCLMLVTALGSQA (SEQ ID NO: 6)
 - b) la secuencia señal de stanniocalcina (MLQNSAVLLLLVISASA, SEQ ID NO: 7)
 - c) la región pre-pro de la secuencia señal de HSA (p. ej., MKWVTFISLLFLFSSAYS SRGVFRR, SEQ ID NO: 8)
 - d) la región pre de la secuencia señal de HSA (p. ej., MKWVTFISLLFLFSSAYS, SEQ ID NO: 9) o variantes de la misma, tales como, por ejemplo, MKWVSFISLLFLFSSAYS, (SEQ ID NO: 10)
 - e) la secuencia señal de invertasa (p. ej., MLLQAFLFLLAGFAAKISA, SEQ ID NO: 11)
 - f) la secuencia señal del factor de apareamiento alfa de levadura (p. ej., MRFPSIFTAVLAFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGV SLEKR, SEQ ID NO: 12 o MRFPSIFTAVLAFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGVS LDKR, SEQ ID NO: 12)
 - g) la secuencia líder de la toxina asesina de *K. lactis*
 - h) una secuencia señal híbrida (p. ej., MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR, SEQ ID NO: 13)
 - i) una secuencia señal híbrida de HSA/MF α -1 (también conocida como HSA/kex2) (p. ej., MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR, SEQ ID NO: 14)
 - j) una secuencia líder de la fusión asesina de *K. lactis*/MF α -1 (p. ej., MNIFYIFLFLSFVQGSLEKR, SEQ ID NO: 15)
 - k) la secuencia señal de inmunoglobulina Ig (p. ej., MGWSCILFLVATATGVHS, SEQ ID NO: 16)
 - l) la secuencia señal del precursor de Fibulina B (p. ej., MERAAPSRRVPLPLLLGGLALLAAGVDA, SEQ ID NO: 17)
 - m) la secuencia señal del precursor de clusterina (p. ej., MMKTLLLFVGLLLTWESGQVLG, SEQ ID NO: 18)
 - n) la secuencia señal de la proteína 4 de unión al factor de crecimiento de tipo insulínico (p. ej., MLPLCLVAALLAAGPGPSLG, SEQ ID NO: 19)
 - o) variantes de la región pre-pro de la secuencia señal de HSA tales como, por ejemplo, MKWVSFISLLFLFSSAYS SRGVFRR (SEQ ID NO: 20), MKWVTFISLLFLFAGVLG (SEQ ID NO: 21), MKWVTFISLLFLFSGVLG (SEQ ID NO: 22), MKWVTFISLLFLFGGVLG (SEQ ID NO: 23), El líder de HSA modificado HSA núm. 64 - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO: 24); El líder de HSA modificado HSA núm. 66 - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO: 25); El líder de HSA modificado (A14) - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO: 26); El líder de HS modificado (S14) (también conocido como HSA modificado núm. 65) - MKWVTFISLLFLFSGVSG (SEQ ID NO: 27), El líder de HSA modificado (G14) - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO: 28), o MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO: 29)
 - p) una secuencia señal consenso (MPTWAWWLFLVLLLALWAPARG, SEQ ID NO: 30)
 - q) líder de la fosfatasa ácida (PH05) (p. ej., MFKSVVYSILAASLANA SEQ ID NO: 31)
 - r) la pre-secuencia de MFoz-1
 - s) la pre-secuencia de 0 glucanasa (BGL2)

t) líder de la toxina asesina

u) la presecuencia de la toxina asesina

v) prepro toxina asesina de *k. lactis* (29 aminoácidos; 16 aminoácidos de pre y 13 aminoácidos de pro) MNIFYIFLFLLSFVQGLEHTRRGSLDKR (SEQ ID NO: 32)

5 w) secuencia líder de secreción de glucoamilasa II de *S. diastaticus*

x) secuencia líder de secreción de α -galactosidasa (MEL1) de *S. carlsbergensis*

y) secuencia líder de glucoamilasa de *Candida*

z) Los líderes híbridos descritos en el documento EP-A-387 319 (incorporado a la presente memoria como referencia)

10 aa) la secuencia señal de gp67 (junto con sistemas de expresión baculovirales) (p. ej., aminoácidos 1-19 de Número de Acceso GenBank AAA72759) o

bb) el líder natural de la proteína terapéutica X;

cc) el líder de invertasa de *S. cerevisiae* (SUC2), como se describe en el documento JP 62-096086 (concedido como 911036516, incorporado a la presente memoria como referencia); o

15 dd) Inulinasa - MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKR (SEQ ID NO: 33).

ee) Una variante del líder del propéptido TA57 modificada núm. 1 - MKLKTVRS AVLSSLFASQVLGQPIDDTSQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDWGLISMAKR (SEQ ID NO: 34)

20 ff) Una variante del líder del propéptido TA57 modificada núm. 2 - MKLKTVRS AVLSSLFASQVLGQPIDDTSQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLISMAEEGEPKR (SEQ ID NO: 35)

gg) Un péptido señal consenso - MWWRLWWLLLLLLLLLWPMWWA (SEQ ID NO: 111)

jj) Una secuencia señal de HSA/kex2 modificada - MKWVSFISLLFLFSSAYSGSLDKR (SEQ ID NO: 112)

kk) Un péptido señal consenso núm. 2 - MRPTWAWWLFLVLLLALWAPARG (SEQ ID NO: 105)

25 En una realización preferida, la secuencia señal de HSA/kex2 modificada (SEQ ID NO: 112) se fusiona al extremo amino de una proteína de fusión de albúmina, incluyendo proteínas de fusión que comprenden albúmina y una proteína terapéutica como se describe en la presente memoria, así como proteínas de fusión de albúmina descritas en los documentos WO93/15199; WO97/24445; WO03/60071; WO03/59934; y PCT/US04/01369, cada uno de los cuales se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. La secuencia señal de HSA/kex2 modificada se basa en la secuencia señal de HSA/kex2 (SEQ ID NO: 14) descrita, p. ej., por Sleep et al. Biotechnology 1990, vol. 8, págs. 42-46; y en la Patente de los Estados Unidos 5.302.697, ambas las cuales se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad. La secuencia líder de HSA/kex2 modificada descrita en la presente memoria contiene una sustitución de aminoácidos no conservativa (Arg por Gly) en el residuo 19 del péptido señal parental. Se ha encontrado que el péptido señal de HSA/kex2 modificado produce un rendimiento de expresión inesperadamente mejor y/o una eficacia de escisión mejor de las proteínas de fusión de albúmina cuando se expresan en levadura que la secuencia señal de HSA/kex2 no modificada. Las variantes del péptido señal de HSA/kex2 modificado también están incluidas en la invención. En particular el residuo Gly de la posición 19 del SEQ ID NO: 112 puede ser sustituido por un residuo Pro. También se contemplan otras variantes por sustitución conservativa de la secuencia señal de HSA/kex2 modificada. Los ácidos nucleicos que codifican la secuencia señal de HSA/kex2 modificada del SEQ ID NO: 112, así como las variantes por sustitución conservativa de la misma, también están incluidos en la invención.

30

35

40

Los vectores que utilizan glutamina sintasa (GS) o DHFR como marcadores seleccionables se pueden amplificar en presencia de los fármacos metionina sulfoximina o metotrexato, respectivamente. Una ventaja de los vectores basados en la glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares (p. ej., la línea de células de mieloma murino, NSO) que son negativas para la glutamina sintasa. Los sistemas de expresión de glutamina sintasa también pueden funcionar en células que expresan glutamina sintasa (p. ej., células de Ovario de Hámster Chino (CHO)) proporcionando un inhibidor adicional para evitar el funcionamiento del gen endógeno. Un sistema de expresión de glutamina sintasa y los componentes del mismo se detallan en las publicaciones PCT: WO87/04462; WO86/05807; WO89/01036; WO89/10404; y WO91/06657, que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad. Adicionalmente, los vectores de expresión de glutamina sintasa se pueden obtener a partir de Lonza Biologicals, Inc. (Portsmouth, NH). La expresión y la producción de anticuerpos monoclonales utilizando un sistema de expresión de GS en células de mieloma murino son descritos por Bebbington et al., Bio/technology 10:169(1992) y por Biblia y Robinson Biotechnol. Prog. 11:1 (1995) que se incorporan a la presente memoria como referencia.

45

50

La presente invención también se refiere a células anfitrionas que contienen los constructos vectores descritos anteriormente descritos en la presente memoria, y adicionalmente incluye células anfitrionas que contienen secuencias de nucleótidos de la invención que están asociadas operablemente con una o más regiones de control heterólogas (p. ej., promotor y/o potenciador) utilizando mecanismos conocidos en la técnica. La célula anfitriona puede ser una célula eucariótica superior, tal como una célula de mamífero (p. ej., una célula derivada de ser humano), o una célula eucariótica inferior, tal como una célula de levadura, o la célula anfitriona puede ser una célula procariótica, tal como una célula bacteriana. Se puede seleccionar una célula anfitriona que modula la expresión de las secuencias génicas insertadas, o modifica y procesa el producto génico de una manera específica deseada. La expresión de ciertos promotores se puede elevar en presencia de ciertos inductores; de ese modo la expresión del polipéptido modificado genéticamente se puede controlar. Además, diferentes células anfitrionas tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación traduccionales y post-traduccionales (p. ej., fosforilación, escisión) de las proteínas. Se pueden seleccionar líneas celulares apropiadas para garantizar las modificaciones y el procesamiento deseados de la proteína foránea expresada.

La introducción de los ácidos nucleicos y constructos de ácido nucleico de la invención en la célula anfitriona se puede efectuar mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, u otros métodos. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis et al., *Basic Methods In Molecular Biology* (1986). Específicamente se contempla que los polipéptidos de la presente invención puedan ser expresados de hecho por una célula anfitriona que carezca de un vector recombinante. Además de las células anfitrionas que contienen los constructos vectores comentadas en la presente memoria, la invención también incluye células anfitrionas primarias, secundarias, e inmortalizadas de origen vertebrado, concretamente de origen mamífero, que han sido modificadas para suprimir o remplazar material genético endógeno (p. ej., la secuencia codificante correspondiente a una proteína Terapéutica puede ser remplazada por una proteína de fusión de albúmina correspondiente a la proteína Terapéutica), y/o para incluir material genético (p. ej., se pueden incluir secuencias de polinucleótidos heterólogas tales como por ejemplo, una proteína de fusión de albúmina de la invención correspondiente a la proteína Terapéutica). El material genético asociado operablemente con el polinucleótido endógeno puede activar, alterar, y/o amplificar polinucleótidos endógenos.

Adicionalmente, se pueden utilizar mecanismos conocidos en la técnica para asociar operablemente polinucleótidos heterólogos (p. ej., polinucleótidos que codifican una proteína de albúmina, o un fragmento o variante de la misma) y/o regiones de control heterólogas (p. ej., promotor y/o potenciador) con secuencias de polinucleótidos endógenas que codifican una proteína Terapéutica a través de una recombinación homóloga (véanse, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.641.670, expedida el 24 de Junio de 1997; la Publicación Internacional Número WO 96/29411; la Publicación Internacional Número WO 94/12650; Koller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); y Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989), cuyas descripciones de incorporan como referencia en su totalidad).

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos incluyendo la precipitación con sulfato de amonio o etanol, la extracción con ácido, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía con fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía de afinidad, la cromatografía con hidroxilapatita, la cromatografía de interacción de carga hidrófoba y cromatografía con lectina. Muy preferiblemente, se emplea la cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación.

En realizaciones preferidas las proteínas de fusión de albúmina de la invención se purifican utilizando la Cromatografía de Intercambio Aniónico incluyendo, pero no limitada a, cromatografía sobre columnas de Q-sefarosa, DEAE sefarosa, poros HQ, poros DEAE, Toyopearl Q, Toyopearl QAE, Toyopearl DEAE, Resource/Source Q y DEAE, Fractogel Q y DEAE.

En realizaciones específicas las proteínas de fusión de albúmina de la invención se purifican utilizando la Cromatografía de Intercambio Catiónico incluyendo, pero no limitada a, columnas SP-sefarosa, CM sefarosa, poros HS, poros CM, Toyopearl SP, Toyopearl CM, Resource/Source S y CM, Fractogel S y CM y sus equivalentes y comparables.

En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención se purifican utilizando la Cromatografía de Interacción Hidrófoba incluyendo, pero no limitada a, columnas de Fenil-, Butil-, Metil-, Octil-, Hexil-sefarosa, Poros Fenil, Butil, Metil, Octil, Hexil, Toyopearl Fenil, Butil, Metil, Octil, Hexil, Resource/Source Fenil, Butil, Metil, Octil, Hexil, Fractogel Fenil, Butil, Metil, Octil, Hexil y sus equivalentes y comparables.

En realizaciones específicas las proteínas de fusión de albúmina de la invención se purifican utilizando la Cromatografía de Exclusión por Tamaño incluyendo, pero no limitada a, columnas de sefarosa S100, S200, S300, resina superdex y sus equivalentes y comparables.

En realizaciones específicas las proteínas de fusión de albúmina de la invención se purifican utilizando una Cromatografía de Afinidad incluyendo, pero no limitada a, columnas Mimetic Dye affinity, de afinidad con péptido y de afinidad con anticuerpo que son selectivas o bien para la HSA o bien para las moléculas "diana de fusión".

En realizaciones preferidas las proteínas de fusión de albúmina de la invención se purifican utilizando uno o más de los métodos de Cromatografía enumerados más arriba. En otras realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención se purifican utilizando una o más de las siguientes columnas de Cromatografía, columna de Q sefarosa FF, columna de SP Sefarosa FF, columna de Q Sefarosa de Alta Resolución, columna de Blue Sefarosa FF, Columna Blue, columna Fenil Sefarosa FF, DEAE Sefarosa FF, o Columna Metil.

Adicionalmente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar utilizando el procedimiento descrito en la Publicación Internacional PCT WO 00/44772 que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. Un experto en la técnica podría modificar fácilmente el procedimiento descrito allí para su uso en la purificación de proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden recuperar de: productos de procedimientos sintéticos químicos; y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un anfitrión procariótico o eucariótico, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insecto, y de mamífero. Dependiendo del anfitrión empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden ser glicosilados y pueden ser no glicosilados. Además, las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden incluir un residuo de metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de procedimientos mediados por el anfitrión. De este modo, es bien sabido en la técnica que la metionina N-terminal codificada por el codón de inicio de la traducción generalmente se elimina con una elevada eficacia de cualquier proteína después de la traducción en todas las células eucarióticas. Si bien la metionina N-terminal en la mayoría de las proteínas también es eliminada eficazmente en la mayoría de los procariotas, para algunas proteínas, este procedimiento de eliminación procariótica es ineficaz, dependiendo de la naturaleza del aminoácido al cual está anclada covalentemente la metionina N-terminal.

En una realización, se utiliza la levadura *Pichia pastoris* para expresar proteínas de fusión de albúmina de la invención en un sistema eucariótico. *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica que puede metabolizar el metanol como su única fuente de carbono. Una etapa principal en la ruta de metabolización del metanol es la oxidación del metanol a formaldehído utilizando O₂. Esta reacción es catalizada por la enzima alcohol oxidasa. Con el fin de metabolizar el metanol como su única fuente de carbono, *Pichia pastoris* debe generar elevados niveles de alcohol oxidasa debido, en parte, a la relativamente baja afinidad de la alcohol oxidasa por el O₂. Por consiguiente, en un medio de crecimiento dependiente de metanol como principal fuente de carbono, la región promotora de uno de los dos genes de alcohol oxidasa (AOX1) es altamente activa. En presencia de metanol, la alcohol oxidasa producida a partir del gen AOX1 comprende hasta aproximadamente 30% de la proteína soluble total en *Pichia pastoris*. Véanse Ellis, S.B., et al., Mol. Cell. Biol. 5:1111-21 (1985); Koutz, P.J., et al., Yeast 5:167-77 (1989); Tschopp, J.F., et al., Nucl. Acids Res. 15:3859-76 (1987). De este modo, una secuencia codificante heteróloga, tal como, por ejemplo, un polinucleótido de la presente invención, bajo la regulación transcripcional de toda o de parte de la secuencia reguladora AOX1 es expresada a niveles excepcionalmente elevados en la levadura *Pichia* desarrollada en presencia de metanol.

En un ejemplo, se utiliza el vector plasmídico pPIC9K para expresar el ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención, como se expone en la presente memoria, en un sistema de levadura de *Pichia* esencialmente como se describe en "Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology," D.R. Higgins y J. Cregg, eds. The Humana Press, Totowa, NJ. 1998. Este vector de expresión permite la expresión y secreción de un polipéptido de la invención en virtud del promotor AOX1 fuerte conectado al péptido señal secretor (es decir, líder) de fosfatasa alcalina (PHO) de *Pichia pastoris* localizado aguas arriba de un sitio de clonación múltiple.

Muchos otros vectores de levadura podrían ser utilizados en lugar de pPIC9K, tales como, pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalfa, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, y PAO815, como apreciará fácilmente un experto en la técnica, con tal que el constructo de expresión propuesto proporcione señales localizadas apropiadamente para la transcripción, la traducción, la secreción (si se desea), y similares, incluyendo un AUG en marco si se requiere.

En otra realización, se puede lograr un elevado nivel de expresión de una secuencia codificante heteróloga, tal como, por ejemplo, un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, mediante la clonación del polinucleótido heterólogo de la invención en un vector de expresión tal como, por ejemplo, pGAPZ o pGAPZalfa, y el desarrollo del cultivo de levadura en ausencia de metanol.

Adicionalmente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden sintetizar químicamente utilizando mecanismos conocidos en la técnica (p. ej., véanse Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y., y Hunkapiller et al., Nature, 310:105-111 (1984)). Por ejemplo, se puede sintetizar un polipéptido correspondiente a un fragmento de un polipéptido mediante el uso de un sintetizador peptídico. Además, si se desea, se pueden introducir aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos como sustitución o adición en la secuencia del polipéptido. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero no se limitan a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α-amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, b-alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como b-metil

aminoácidos, Ca-metil aminoácidos, Na-metil aminoácidos, y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser D (dextrógiro) o L (levógiro).

La invención incluye proteínas de fusión de albúmina de la presente invención que son modificadas diferencialmente durante o después de la traducción, p. ej., mediante glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, conexión con una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante mecanismos conocidos, incluyendo, pero no limitados a, escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH₄; acetilación, formilación, oxidación, reducción; síntesis metabólica en presencia de tunicamicina; etc.

Las modificaciones post-traduccionales adicionales abarcadas por la invención incluyen, por ejemplo, p. ej., cadenas de carbohidratos unidas a N o unidas a O, procesamiento de extremos N terminales o C terminales), anclaje de radicales químicos a la cadena principal de aminoácido, modificaciones químicas de cadenas de carbohidratos unidas a N o unidas a O, y adición o delección de un residuo de metionina N terminal como resultado de la expresión de una célula anfitriona procariótica. Las proteínas de fusión de albúmina también se pueden modificar con una marca detectable, tal como una marca enzimática, fluorescente, isotópica o de afinidad para permitir la detección y el aislamiento de la proteína.

Los ejemplos de las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de los complejos del grupo prostético adecuado incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamin-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de los materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los ejemplos del material radiactivo adecuado incluyen yodo (¹²¹I, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹¹In, ¹¹²In, ^{113m}In, ^{115m}In), tecnecio (⁹⁹Tc, ^{99m}Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenon (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴¹Pr, ¹⁰⁵Rh, y ⁹⁷Ru.

En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención o los fragmentos o variantes de las mismas están anclados a quelantes macrocíclicos que se asocian con iones radiometálicos, incluyendo pero no limitados a, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹⁶⁶Ho, y ¹⁵³Sm, a polipéptidos. En una realización preferida, el ión radiometálico asociado con los quelantes macrocíclicos es ¹¹¹In. En otra realización preferida, el ión radiometálico asociado con el quelante macrocíclico es ⁹⁰Y. En realizaciones específicas, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA). En otras realizaciones específicas, el DOTA está anclado a un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo a través de una molécula conectora. Los ejemplos de las moléculas conectoras útiles para conjugar DOTA a un polipéptido son comúnmente conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, DeNardo et al., Clin Cancer Res. 4(10):2483-90 (1998); Peterson et al., Bioconjug. Chem. 10(4):553-7 (1999); y Zimmerman et al., Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50 (1999); que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Como se ha mencionado, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser modificadas por medio de procedimientos naturales, tales como el procesamiento post-traducciona, o por medio de mecanismos de modificación química que son bien conocidos en la técnica. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en diversos sitios en un polipéptido dado. Los polipéptidos de la invención pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de ubicuitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificaciones. Los polipéptidos cíclicos, ramificados, y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales post-traduccionales o se pueden elaborar mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, anclaje covalente de flavina, anclaje covalente de un radical hemo, anclaje covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, anclaje covalente de un lípido o derivado de lípido, anclaje covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclas de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, tratamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia tales como arginilación, y ubicuitinación. (Véanse, por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)).

Las proteínas de fusión de la invención y los anticuerpos que se unen a una proteína Terapéutica o fragmentos o variantes de la misma se pueden fusionar a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otras, muchas de las cuales se encuentran disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de

"HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) y la etiqueta "flag".

Adicionalmente, una proteína de fusión de albúmina de la invención se puede conjugar con un radical terapéutico tal como una citotoxina, p. ej., un agente citostático o citocida, un agente radiactivo o un ión metálico radiactivo, p. ej., emisores alfa tales como, por ejemplo, ²¹³Bi. Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracino diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1,1-dihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos y homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-descarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa-clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina-platino (ID (DDP) cisplatino), antraciclina (p. ej., daunorrubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Los productos conjugados de la invención se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o radical farmacéutico no se debe considerar limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el radical farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón alfa, interferón b, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, p. ej., TNF-alfa, TNF-beta, AIM I (Véase, la Publicación Internacional Núm. WO 97/33899), AIM II (Véase, la Publicación Internacional Núm. WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi et al., Int. Immunol. 6:1567-1574 (1994)), VEGI (Véase, la Publicación Internacional Núm. WO 99/23105), un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulador de las colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de las colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento. Los mecanismos para conjugar semejante radical terapéutico a proteínas (p. ej., proteínas de fusión de albúmina) son bien conocidos en la técnica.

Las proteínas de fusión de albúmina también se pueden anclar a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoanálisis o purificación de polipéptidos que están unidos por, que se unen a, o se asocian con proteínas de fusión de albúmina de la invención. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

Las proteínas de fusión de albúmina, con o sin un radical terapéutico conjugado, administradas solas o combinadas con uno o varios factores citotóxicos y/o una o varias citoquinas se pueden utilizar como agentes terapéuticos.

En realizaciones en las que la proteína de fusión de albúmina de la descripción comprende solamente el dominio VH de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, puede ser necesario y/o deseable expresar simultáneamente la proteína de fusión con el dominio VL del mismo anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, de manera que la proteína de fusión de VH-albúmina se asociará (covalentemente o no covalentemente) post-traduccionalmente.

En realizaciones en las que la proteína de fusión de albúmina de la descripción comprende solamente el dominio VL de un anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, puede ser necesario y/o deseable expresar simultáneamente la proteína de fusión con el dominio VH del mismo anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica, de manera que la proteína de fusión de VL-albúmina y la proteína VH se asociarán (covalentemente o no covalentemente) post-traduccionalmente.

Algunos anticuerpos Terapéuticos son anticuerpos biespecíficos, lo que significa que el anticuerpo que se une a una proteína Terapéutica es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Con el fin de crear una proteína de fusión de albúmina correspondiente a esa proteína Terapéutica, es posible crear una proteína de fusión de albúmina que tiene un fragmento scFv fusionado tanto al extremo N como al C del radical de la proteína de albúmina. Más concretamente, el scFv fusionado al extremo N de la albúmina correspondería a uno de los pares pesada/ligera (VH/VL) del anticuerpo original que se une a una proteína Terapéutica y el scFv fusionado al extremo C de la albúmina correspondería a otro par pesada/ligera (VH/VL) del anticuerpo original que se une a una proteína Terapéutica.

También se proporcionan en la invención derivados químicamente modificados de las proteínas de fusión de albúmina de la invención que pueden proporcionar ventajas adicionales tales como una mayor solubilidad, estabilidad y tiempo de circulación del polipéptido, o una menor inmunogenicidad (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.179.337). Los radicales químicos para la derivatización se pueden seleccionar entre polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico) y similares. Las proteínas de fusión de albúmina se pueden modificar en posiciones al azar

dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más radicales químicos anclados.

El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. Para el polietilenglicol, el peso molecular preferido está entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa (indicando el término "aproximadamente" que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular establecido) para facilitar la manipulación y la fabricación. Se pueden utilizar otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (p. ej., la duración de la liberación sostenida deseada, los efectos, si los hubiera, sobre la actividad biológica, la facilidad de manipulación, el grado o carencia de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol para la proteína Terapéutica o análogo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10.000, 10.500, 11.000, 11.500, 12.000, 12.500, 13.000, 13.500, 14.000, 14.500, 15.000, 15.500, 16.000, 16.500, 17.000, 17.500, 18.000, 18.500, 19.000, 19.500, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000, o 100.000 kDa.

Como se ha observado anteriormente, el metilenglicol puede tener una estructura ramificada. Los polietilenglicoles ramificados se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.643.575; Morpurgo et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996); Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999); y Caliceti et al., Bioconjug. Chem. 10:638-646 (1999), cuyas descripciones se incorporan a la presente memoria como referencia.

Las moléculas de polietilenglicol (u otros radicales químicos) deben estar ancladas a la proteína teniendo en cuenta los dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Existen numerosos métodos de anclaje disponibles para los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el método descrito en el documento EP 0 401 384 (acoplamiento de PEG a G-CSF), incorporado a la presente memoria como referencia; véase también Malik et al., Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992), que se refiere a la pegilación de GM-CSF utilizando cloruro de tresilo. Por ejemplo, el polietilenglicol puede estar unido covalentemente a través de residuos de aminoácido por un grupo reactivo, tal como un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son aquellos a los que se puede unir una molécula de polietilenglicol activada. Los residuos de aminoácido que tienen un grupo amino libre pueden incluir residuos de lisina y residuos de aminoácido N terminales; los que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuo de aminoácido C terminal. Los grupos sulfhidrido también se pueden utilizar como grupo reactivo para el anclaje de moléculas de polietilenglicol. Para fines terapéuticos se prefiere el anclaje en un grupo amino, tal como el anclaje en el extremo N o el grupo lisina.

Como se ha sugerido anteriormente, el polietilenglicol se puede anclar a proteínas por medio de cualquiera de numerosos residuos de aminoácido. Por ejemplo, el polietilenglicol se puede ligar a proteínas a través de enlaces covalentes con residuos de lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, o cisteína. Se pueden emplear una o más químicas de reacción para anclar el polietilenglicol a residuos de aminoácido específicos (p. ej., lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, o cisteína) de la proteína o a más de un tipo de residuo de aminoácido (p. ej., lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína y combinaciones de los mismos) de la proteína.

Se pueden desear específicamente proteínas modificadas químicamente en el extremo N. Utilizando polietilenglicol como ilustración de la presente composición, se puede seleccionar entre una variedad de moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilenglicol con respecto a moléculas de proteína (polipéptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación que se va a llevar a cabo, y el método de obtención de la proteína pegilada N-terminalmente seleccionada. El método de obtención de la preparación pegilada N-terminalmente (esto es, separando este radical de otros radicales monopegilados si fuera necesario) puede ser mediante purificación del material pegilado N-terminalmente de una población de moléculas de proteína pegiladas. Se puede lograr la modificación de proteínas selectivas modificadas químicamente en el extremo N mediante alquilación reductiva que explota la reactividad diferencial de tipos diferentes de grupos amino primarios (lisina versus N-terminal) disponibles para la derivatización en una proteína concreta. En condiciones de reacción apropiadas, se logra la derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N con un polímero que contiene un grupo carbonilo.

Como se ha indicado anteriormente, la pegilación de las proteínas de fusión de albúmina de la invención se puede lograr mediante cualquiera de numerosos medios. Por ejemplo, se puede anclar polietilenglicol a la proteína de fusión de albúmina directamente o a través de un conector intermedio. Se describen sistemas sin conectores para anclar polietilenglicol a proteínas en Delgado et al., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992); Francis et al., Intern. J. of Hematol. 68:1-18 (1998); Patente de los Estados Unidos Núm. 4.002.531; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.349.052; documentos WO 95/06058; y WO 98/32466, cuyas descripciones se incorporan a la presente memoria como referencia.

Un sistema para anclar polietilenglicol directamente a residuos de aminoácido de proteínas sin un conector intermedio emplea MPEG tresilado, que es producido mediante la modificación de monometoxipolietilenglicol (MPEG) utilizando cloruro de tresilo ($\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$). Tras la reacción de la proteína con MPEG tresilado, el polietilenglicol se ancla directamente a grupos amino de la proteína. De este modo, la invención incluye productos conjugados de proteína-polietilenglicol producidos haciendo reaccionar las proteínas de la invención con una

molécula de polietilenglicol que tiene un grupo 2,2,2-trifluoroetanosulfonilo.

El polietilenglicol también se puede anclar a proteínas utilizando numerosos conectores intermedios diferentes. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.612.460, cuya descripción se incorpora a la presente memoria como referencia, describe conectores de uretano para conectar polietilenglicol a proteínas. Los productos conjugados de proteína-polietilenglicol en donde el polietilenglicol está anclado a la proteína por medio de un conector también pueden ser producidos por reacción de proteínas con compuestos tales como MPEG-succinimidilsuccinato, MPEG activado con 1,1'-carbonildiimidazol, MPEG- 2,4,5-triclorofenilcarbonato, MPEG-p-nitrofenilcarbonato, y diversos derivados de MPEG-succinato. Numerosos derivados de polietilenglicol adicionales y químicas de reacción para el anclaje de polietilenglicol a proteínas se describen en la Publicación Internacional Núm. WO 98/32466, cuya descripción se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. Los productos de proteína pegilados producidos utilizando las químicas de reacción expuestas en la presente memoria están incluidos en el alcance de la invención.

El número de radicales de polietilenglicol anclados a cada proteína de fusión de albúmina de la invención (es decir, el grado de sustitución) también puede variar. Por ejemplo, las proteínas pegiladas de la invención pueden ser conectadas, por término medio, a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, o más moléculas de polietilenglicol. De un modo similar, el grado medio de sustitución estará dentro de intervalos tales como 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, o 18-20 radicales de polietilenglicol por molécula de proteína. Los métodos para determinar el grado de sustitución se comentan, por ejemplo, en Delgado et al., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992).

Los polipéptidos de la invención se pueden recuperar y purificar a partir de la síntesis química y los cultivos de células recombinantes mediante métodos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Muy preferiblemente, se emplea la cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación. Se pueden emplear técnicas conocidas para el replegamiento de proteínas para regenerar una conformación activa cuando el polipéptido se desnaturalice durante el aislamiento y/o la purificación.

La presencia y la cantidad de proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden determinar utilizando ELISA, un inmunoanálisis bien conocido en la técnica. Un protocolo de ELISA que fuera útil para detectar/cuantificar proteínas de fusión de albúmina de la invención, comprendería las etapas de recubrimiento de una placa de ELISA con un anticuerpo anti-albúmina de suero humana, bloqueo de la placa para evitar la unión no específica, lavado de la placa de ELISA, adición de una solución que contenga la proteína de fusión de albúmina de la invención (a una o más concentraciones diferentes), la adición de un anticuerpo secundario específico anti-proteína Terapéutica acoplado a una marca detectable (como se describe en la presente memoria o conocido de otro modo en la técnica), y la detección de la presencia del anticuerpo secundario. En una versión alternativa de este protocolo, la placa de ELISA se podría recubrir con el anticuerpo específico anti-proteína Terapéutica y el reactivo secundario marcado podría ser un anticuerpo específico anti-albúmina humana.

Usos de los Polinucleótidos

Cada uno de los polinucleótidos identificados en la presente memoria se puede utilizar de numerosas maneras como reactivos. La siguiente descripción se debe considerar ilustrativa y utiliza técnicas conocidas.

Los polinucleótidos de la presente invención son útiles para producir las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Como se describe con más detalle a continuación, los polinucleótidos de la invención (que codifican las proteínas de fusión de albúmina) se pueden utilizar en métodos de ADN recombinantes útiles en la modificación genética para elaborar células, líneas celulares, o tejidos que expresan la proteína de fusión de albúmina codificada por los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Los polinucleótidos de la presente invención también son útiles en la terapia génica. Un objetivo de la terapia génica es insertar un gen normal en un organismo que tiene un gen defectuoso, en un esfuerzo para corregir el defecto genético. Los polinucleótidos descritos en la presente invención ofrecen un método para localizar tales defectos genéticos de una manera muy precisa. Otro objetivo es insertar un nuevo gen que no estaba presente en el genoma del anfitrión, produciendo de ese modo un nuevo rasgo en la célula anfitriona. Los ejemplos no limitantes adicionales de métodos de terapia génica abarcados por la presente invención se describen muy exhaustivamente en alguna parte en la presente memoria (véanse, p. ej., las secciones denominadas "Terapia Génica", y los Ejemplos 61 y 62).

Usos de los Polipéptidos

Cada uno de los polipéptidos identificados en la presente memoria se puede utilizar de numerosas maneras. La siguiente descripción se debe considerar ilustrativa y utiliza técnicas conocidas.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención son útiles para proporcionar sondas inmunológicas para la identificación diferencial del tejido o los tejidos (p. ej., análisis inmunohistoquímicos tales como, por ejemplo, ABC inmunoperoxidasa (Hsu et al., J. Histochem. Cytochem. 29:577-580 (1981)) o del tipo o los tipos de células (p. ej.,

análisis inmunocitoquímicos).

Las proteínas de fusión de albúmina se pueden utilizar para analizar los niveles de polipéptidos en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., véase Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos útiles para detectar la expresión de genes de proteínas incluyen inmunoanálisis, tales como el análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) y el radioinmunoanálisis (RIA). Las marcas de análisis adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen marcas enzimáticas, tales como , glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{111}In , ^{112}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, $^{15\text{m}}\text{In}$), y tecnecio (^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenon (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru ; marcas luminiscentes, tales como luminol; y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden detectar *in vivo* mediante formación de imágenes. Las marcas o marcadores para la formación de imágenes *in vivo* de proteínas incluyen aquellos detectables mediante radiografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) o relajación de espín electrónico (ESR). Para la radiografía de rayos X, las marcas adecuadas incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero no son manifiestamente nocivos para el sujeto. Los marcadores adecuados para RMN o ESR incluyen aquellos con un espín característico detectable, tales como deuterio, que se puede incorporar a la proteína de fusión de albúmina mediante marcaje de nutrientes proporcionados a una línea celular que expresa la proteína de fusión de albúmina de la invención.

Una proteína de fusión de albúmina que ha sido marcada con un radical de formación de imágenes detectable, tal como un radioisótopo (por ejemplo, ^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{111}In , ^{112}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, $^{15\text{m}}\text{In}$), y tecnecio (^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenon (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{141}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru), una sustancia radio-opaca, o un material detectable mediante resonancia magnética nuclear, es introducida (por ejemplo, parenteralmente, subcutáneamente o intraperitonealmente) en el mamífero que se va a examinar para determinar un trastorno inmunitario. Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de formación de imágenes utilizado determinarán la cantidad de radical formador de imágenes necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un radical radioisotópico, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada oscilará normalmente entre aproximadamente 5 y 20 milicurios de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La proteína de fusión de albúmina marcada se acumulará a continuación preferentemente en localizaciones del organismo (p. ej., órganos, células, espacios extracelulares o matrices) en las que se localizan uno o más receptores, ligandos o sustratos (correspondientes a la de la proteína Terapéutica utilizada para elaborar la proteína de fusión de albúmina de la invención). Alternativamente, en el caso en el que la proteína de fusión de albúmina comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo Terapéutico, la proteína de fusión de albúmina marcada se acumulará preferentemente en las localizaciones del organismo (p. ej., órganos, células, espacios extracelulares o matrices) en las que se localizan los polipéptidos/epítomos correspondientes a aquellos unidos por el anticuerpo Terapéutico (utilizado para elaborar la proteína de fusión de albúmina de la invención). La formación de imágenes *in vivo* es descrita por S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)). Los protocolos descritos allí podrían ser modificados fácilmente por un experto en la técnica para su uso con las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

En una realización, la invención proporciona un método para la liberación específica de proteínas de fusión de albúmina de la invención en células mediante la administración de proteínas de fusión de albúmina de la invención (p. ej., polipéptidos codificados por polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o anticuerpos) que están asociadas con polipéptidos o ácidos nucleicos heterólogos. En un ejemplo, la invención proporciona un método para liberar una proteína Terapéutica en la célula elegida como diana. En otro ejemplo, la invención proporciona un método para liberar un ácido nucleico de hebra sencilla (p. ej., antisentido o ribozimas) o un ácido nucleico de doble hebra (p. ej., ADN que se puede integrar en el genoma de una célula o replicar episómicamente y que se puede transcribir) en la célula elegida como diana.

En otra realización, la invención proporciona un método para la destrucción específica de células (p. ej., la destrucción de células tumorales) mediante la administración de proteínas de fusión de albúmina de la invención asociadas con toxinas o profármacos citotóxicos.

Por "toxina" se quiere significar uno o más compuestos que se unen y activan sistemas efectores citotóxicos endógenos, radioisótopos, holotoxinas, toxinas modificadas, subunidades catalíticas de toxinas, o cualquier molécula o enzima normalmente no presente en o sobre la superficie de una célula que en condiciones definidas causan la muerte de la célula. Las toxinas que se pueden utilizar de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos conocidos en la técnica, compuestos tales como, por ejemplo, anticuerpos (o porciones que contienen fijadores del complemento de los mismos) que se unen a un sistema efector citotóxico endógeno inducido o inherente, timidina quinasa, endonucleasa, ARNasa, toxina alfa, ricina, abrina, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina de la difteria, saporina, momordina, gelonina, proteína antiviral de hierba carmín, alfa-sarcina y toxina del cólera. "Toxina" también incluye un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico

radiactivo, p. ej., emisores alfa tales como, por ejemplo, ^{213}Bi , u otros radioisótopos tales como, por ejemplo, ^{103}Pd , ^{133}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , $^{90}\text{Yttrio}$, ^{117}Tin , $^{156}\text{Renio}$, $^{166}\text{Holmio}$, y $^{188}\text{Renio}$; marcas luminiscentes, tales como luminol; y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina. En una realización específica, la invención proporciona un método para la destrucción específica de células (p. ej., la destrucción de células tumorales) mediante la administración de polipéptidos de la invención o anticuerpos de la invención asociados con el radioisótopo ^{90}Y . En otra realización específica, la invención proporciona un método para la destrucción específica de células (p. ej., la destrucción de células tumorales) mediante la administración de polipéptidos de la invención o anticuerpos de la invención asociados con el radioisótopo ^{111}In . En una realización específica adicional, la invención proporciona un método para la destrucción específica de células (p. ej., la destrucción de células tumorales) mediante la administración de polipéptidos de la invención o anticuerpos de la invención asociados con el radioisótopo ^{131}I .

Los mecanismos conocidos en la técnica se pueden aplicar a los polipéptidos idóneos de la invención. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan, al uso de agentes de conjugación bifuncionales (véanse p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.756.065; 5.714.631; 5.696.239; 5.652.361; 5.505.931; 5.489.425; 5.435.990; 5.428.139; 5.342.604; 5.274.119; 4.994.560; y 5.808.003).

Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención son útiles para el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y/o el pronóstico de diversos trastornos en mamíferos, preferiblemente humanos. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en el encabezamiento "Actividades Biológicas" de más abajo.

De este modo, la invención proporciona un método de diagnóstico de un trastorno, que implica (a) analizar el nivel de expresión de un cierto polipéptido en las células o el fluido corporal de un individuo utilizando una proteína de fusión de albúmina de la invención; y (b) comparar el nivel de expresión del polipéptido analizado con un nivel de expresión del polipéptido patrón, por medio de lo cual un incremento o un descenso en el nivel de expresión de polipéptido analizado en comparación con el nivel de expresión patrón es indicativo de un trastorno. Con respecto al cáncer, la presencia de una cantidad relativamente elevada de transcrito en el tejido sometido a biopsia de un individuo puede indicar una predisposición al desarrollo de la enfermedad, o puede proporcionar un método para detectar la enfermedad antes de la aparición de los síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir a los profesionales de la salud emplear medidas preventivas o tratamientos agresivos antes, evitando de ese modo el desarrollo o progreso adicional del cáncer.

Por otra parte, las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden utilizar para tratar o prevenir enfermedades o afecciones tales como, por ejemplo, trastornos neurales, trastornos del sistema inmunitario, trastornos musculares, trastornos reproductivos, trastornos gastrointestinales, trastornos pulmonares, trastornos cardiovasculares, trastornos renales, trastornos proliferativos, y/o enfermedades y afecciones cancerosas. Por ejemplo, se puede administrar a los pacientes un polipéptido de la presente invención en un esfuerzo para reemplazar niveles ausentes o reducidos del polipéptido (p. ej., insulina), para complementar niveles ausentes o reducidos de un polipéptido diferente (p. ej., hemoglobina S por hemoglobina B, SOD, catalasa, proteínas de reparación de ADN), para inhibir la actividad de un polipéptido (p. ej., un oncogén o un supresor tumoral), para activar la actividad de un polipéptido (p. ej., mediante unión a un receptor), para reducir la actividad de un receptor unido a membrana compitiendo con él por el ligando libre (p. ej., receptores de TNF solubles utilizados en la reducción de la inflamación), o para ocasionar una respuesta deseada (p. ej., inhibición del crecimiento de los vasos sanguíneos, potenciación de la respuesta inmunitaria células o tejidos proliferativos).

En particular, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo Terapéutico también se pueden utilizar para tratar la enfermedad (como se ha descrito más arriba, y en otra parte en la presente memoria). Por ejemplo, la administración de una proteína de fusión de albúmina que comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo Terapéutico se puede unir a, y/o neutralizar el polipéptido al cual se une específicamente el anticuerpo Terapéutico utilizado para elaborar la proteína de fusión de albúmina, y/o reducir la producción en exceso del polipéptido al cual se une específicamente el anticuerpo Terapéutico utilizado para elaborar la proteína de fusión de albúmina. De un modo similar, la administración de una proteína de fusión de albúmina que comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo Terapéutico puede activar el polipéptido al cual se une específicamente el anticuerpo Terapéutico utilizado para elaborar la proteína de fusión de albúmina, mediante la unión al polipéptido unido a una membrana (receptor).

Como mínimo, las proteínas de fusión de albúmina de la invención de la presente invención se pueden utilizar como marcadores de peso molecular sobre geles de SDS-PAGE o sobre columnas de filtración en gel con tamices moleculares utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden utilizar para originar anticuerpos, que a su vez se pueden utilizar para medir la expresión de proteína de la proteína Terapéutica, la proteína de albúmina, y/o la proteína de fusión de albúmina de la invención a partir de una célula recombinante, como modo de evaluación de la transformación de la célula anfitriona, o en una muestra biológica. Por otra parte, las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden utilizar para someter a ensayo las actividades biológicas descritas en la presente memoria.

Análisis de diagnóstico

Los compuestos de la presente invención son útiles para el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y/o el pronóstico de diversos trastornos en mamíferos, preferiblemente seres humanos. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos para cada proteína Terapéutica en la correspondiente fila de la Tabla 1 y en la presente memoria bajo los encabezamientos "Actividad Inmunitaria", "Trastornos Relacionados con la Sangre", "Trastornos Hiperproliferativos", "Trastornos Renales", "Trastornos Cardiovasculares", "Trastornos Respiratorios", "Actividad Anti-Angiogénesis", "Enfermedades a Nivel Celular", "Curación de Heridas y Proliferación de Células Epiteliales", "Actividad Neural y Enfermedades Neurológicas", "Trastornos Endocrinos", "Trastornos del Sistema Reproductor", "Enfermedad Infecciosa", "Regeneración" y/o "Trastornos Gastrointestinales", de más abajo.

Para numerosos trastornos, se pueden detectar niveles sustancialmente alterados (incrementados o disminuidos) de expresión génica en tejidos, células o fluidos corporales (p. ej., sueros, plasma, orina, semen, fluido sinovial o líquido cefalorraquídeo) tomados de un individuo que tiene semejante trastorno, con respecto a un nivel de expresión génica "patrón", esto es, el nivel de expresión en tejidos o fluidos corporales de un individuo que no tiene el trastorno. De este modo, la invención proporciona un método de diagnóstico útil durante el diagnóstico de un trastorno, que implica medir el nivel de expresión del gen que codifica un polipéptido en tejidos, células o fluido corporal de un individuo y comparar el nivel de expresión génica medido con un nivel de expresión génica patrón, por medio de lo cual un incremento o una disminución en los niveles de expresión del gen en comparación con el patrón es indicativo de un trastorno. Estos análisis de diagnóstico se pueden llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*, tal como, por ejemplo, en muestras de sangre, tejido de biopsia o tejido de autopsia.

La presente invención también es útil como indicador pronóstico, por medio de lo cual los pacientes que muestran una expresión del gen potenciada o deprimida experimentarán un resultado clínico peor.

Por "análisis del nivel de expresión del gen que codifica un polipéptido" se quiere significar la medición o estimación cualitativa o cuantitativa del nivel de un polipéptido concreto (p. ej., un polipéptido correspondiente a una proteína Terapéutica descrita en la Tabla 1) o el nivel del ARNm que codifica el polipéptido de la invención en una primera muestra biológica ya sea directamente (p. ej., determinando o estimando el nivel absoluto de proteína o el nivel de ARNm) ya sea relativamente (p. ej., comparando el nivel de polipéptido o el nivel de ARNm en una segunda muestra biológica). Preferiblemente, el nivel de expresión del polipéptido o el nivel de ARNm en la primera muestra biológica se miden o se estiman y se comparan con un nivel de polipéptido o un nivel de ARNm patrón, tomándose el patrón de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o determinándose mediante el cálculo de la media de los niveles de una población de individuos que no tienen el trastorno. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce el nivel de polipéptido o el nivel de ARNm patrón, éste se puede utilizar repetidamente como patrón para la comparación.

Por "muestra biológica" se quiere significar cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, línea celular, u otra fuente que contenga polipéptidos de la invención (incluyendo porciones de los mismos) o ARNm. Como se ha indicado, las muestras biológicas incluyen fluidos corporales (tales como suero, plasma, orina, fluido sinovial y líquido cefalorraquídeo) y fuentes de tejido que se ha encontrado que expresan la totalidad o fragmentos de un polipéptido o ARNm. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales de mamíferos son bien conocidos en la técnica. Cuando la muestra biológica incluye ARNm, el tejido de biopsia es la fuente preferida.

El ARN celular total se puede aislar de una muestra biológica utilizando cualquier mecanismo adecuado tal como el método de tiocianato-fenol cloroformo de una sola etapa descrito por Chomezynski y Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-159 (1987). Los niveles de ARNm que codifica los polipéptidos de la invención se analizan a continuación utilizando cualquier método apropiado. Estos incluyen análisis de transferencia Northern, mapeo con nucleasa S1, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcripción inversa combinada con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), y transcripción inversa combinada con reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR).

La presente invención también se refiere a análisis de diagnóstico tales como análisis cuantitativos y de diagnóstico para la detección de niveles de polipéptidos que se unen a, están unidos a, o se asocian con proteínas de fusión de albúmina de la invención, en una muestra biológica (p. ej., células y tejidos), incluyendo la determinación de niveles normales y anormales de polipéptidos. De este modo, por ejemplo, se puede utilizar un análisis de diagnóstico de acuerdo con la invención para detectar la expresión anormal de polipéptidos que se unen a, están unidos a, o se asocian con proteínas de fusión de albúmina en comparación con muestras de tejido de control normal para detectar la presencia de tumores. Los mecanismos de análisis que se pueden utilizar para determinar los niveles de un polipéptido que se une a, está unido a, o se asocia con proteínas de fusión de albúmina de la presente invención en una muestra derivada de un anfitrión son bien conocidos por expertos en la técnica. Tales métodos de análisis incluyen radioinmunoanálisis, análisis de unión competitiva, análisis de Trasferencia Western y análisis ELISA. El análisis de los niveles de polipéptido en una muestra biológica se puede producir utilizando cualquier método conocido en la técnica.

El análisis de los niveles de polipéptido en una muestra biológica se puede producir utilizando una variedad de mecanismos. Por ejemplo, se puede estudiar la expresión del polipéptido en tejidos mediante métodos inmunohistológicos clásicos (Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol.

105:3087-3096 (1987)). Otros métodos útiles para detectar la expresión del gen del polipéptido incluyen inmunoanálisis, tales como análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) y radioinmunoanálisis (RIA). Las marcas para análisis de anticuerpos adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen marcas enzimáticas, tales como, glucosa oxidasa, y radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{124}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In), y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

El tipo de tejido o célula que se vaya a analizar incluirá generalmente aquellos que se sabe, o se sospecha, que expresan el gen de interés (tal como, por ejemplo, canceroso). Los métodos de aislamiento de proteínas empleados en la presente memoria pueden ser, por ejemplo, los descritos por Harlow y Lane (Harlow, E. y Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York), que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. Las células aisladas pueden derivar de un cultivo celular o de un paciente. Los análisis de células tomadas de un cultivo pueden ser una etapa necesaria en la evaluación de células que se podría utilizar como parte de un mecanismo de terapia génica basado en células o, alternativamente, para someter a ensayo el efecto de los compuestos sobre la expresión del gen.

Por ejemplo, las proteínas de fusión de albúmina se pueden utilizar para detectar cuantitativamente o cualitativamente la presencia de polipéptidos que se unen a, están unidos a, o se asocian con proteínas de fusión de albúmina de la presente invención. Esto se puede completar, por ejemplo, mediante mecanismos de inmunofluorescencia que emplean una proteína de fusión de albúmina marcada fluorescentemente acoplada a una detección con microscopio óptico, citometría de flujo, o fluorimétrica.

En una realización preferida, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une específicamente a al menos una proteína Terapéutica descrita en la presente memoria (p. ej., las proteínas Terapéuticas descritas en la Tabla 1) o conocida de otro modo en la técnica se pueden utilizar para detectar cuantitativamente o cualitativamente la presencia de productos génicos o variantes conservadas o fragmentos de péptidos de las mismas. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante técnicas de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo marcado fluorescentemente acopladas a una detección mediante microscopía óptica, citometría de flujo, o detección fluorimétrica.

Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden emplear, adicionalmente histológicamente, como en los análisis de inmunofluorescencia, de microscopía inmuno-electrónica o no inmunológicos, para la detección in situ de polipéptidos que se unen a, están unidos a, o se asocian con una proteína de fusión de albúmina de la presente invención. La detección in situ se puede completar eliminando un espécimen histológico de un paciente, y aplicando a este un anticuerpo marcado o un polipéptido de la presente invención. Las proteínas de fusión de albúmina se aplican preferiblemente superponiendo las proteínas de fusión de albúmina marcadas sobre una muestra biológica. Utilizando semejante procedimiento, es posible determinar no solamente la presencia de los polipéptidos que se unen a, están unidos a, o se asocian con proteínas de fusión de albúmina, sino también su distribución en el tejido examinado. Utilizando la presente invención, los expertos normales en la técnica percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como los procedimientos de tinción) puede ser modificado con el fin de lograr semejante detección in situ.

Los inmunoanálisis y los no inmunoanálisis que detectan polipéptidos que se unen a, están unidos a, o se asocian con las proteínas de fusión de albúmina comprenderán típicamente la incubación de una muestra, tal como un fluido biológico, un extracto tisular, células recién cosechadas, o productos lisados de células que han sido incubadas en cultivo celular, en presencia de un anticuerpo marcado detectablemente capaz de unirse a productos génicos o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de los mismos, y la detección del anticuerpo unido mediante cualquiera de los numerosos mecanismos bien conocidos en la técnica.

La muestra biológica se puede poner en contacto con, e inmovilizar sobre, un soporte en fase sólida o un portador tal como nitrocelulosa, u otro soporte sólido que sea capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte se puede lavar a continuación con tampones adecuados, seguido de tratamiento con la proteína de fusión de albúmina marcada detectablemente de la invención. El soporte en fase sólida se puede lavar a continuación con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo o polipéptido no unidos. Opcionalmente el anticuerpo se marca con posterioridad. La cantidad de marca unida sobre el soporte sólido se puede detectar a continuación mediante métodos convencionales.

Por "soporte en fase sólida o portador" se quiere significar cualquier soporte capaz de unirse a un polipéptido (p. ej., una proteína de fusión de albúmina, o un polipéptido que se une a, está unido a, o se asocia con una proteína de fusión de albúmina de la invención). Los soportes o portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros, y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble hasta cierto punto o insoluble para los fines de la presente invención. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible con tal que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un polipéptido. De este modo, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una cuenta, o cilíndrica, como en la superficie interna de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una lámina, una tira de ensayo, etc. Los soportes preferidos incluyen cuentas de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán muchos otros portadores adecuados para la unión del anticuerpo o antígeno, o serán capaces de averiguar los mismos mediante

el uso de la experimentación rutinaria.

La actividad de unión de un lote dado de proteína de fusión de albúmina se puede determinar de acuerdo con métodos bien conocidos. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de análisis operativas y óptimas para cada determinación empleando la experimentación rutinaria.

- 5 Además de analizar los niveles de polipéptido en una muestra biológica obtenida de un individuo, el polipéptido también se puede detectar *in vivo* mediante formación de imágenes. Por ejemplo, en una realización de la invención, las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para formar imágenes de células enfermas o neoplásicas.

- 10 Las marcas o marcadores para la formación de imágenes *in vivo* de proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen aquellos detectables mediante radiografía de rayos X, NMR, MRI, barridos por CAT o ESR. Para la radiografía por rayos X, las marcas adecuadas incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero no son abiertamente nocivas para el sujeto. Los marcadores adecuados por NMR y ESR incluyen aquellos con un espín característico detectable, tal como deuterio, que se puede incorporar a la proteína de fusión de albúmina mediante marcaje de nutrientes de una línea celular (o cepa bacteriana o de levadura) modificada.

- 15 Adicionalmente, se pueden administrar las proteínas de fusión de albúmina de la invención cuya presencia se puede detectar. Por ejemplo, las proteínas de fusión de albúmina de la invención marcadas con un compuesto radio-opaco u otro compuesto apropiado se pueden administrar y visualizar *in vivo*, como se ha comentado anteriormente para los anticuerpos marcados. Adicionalmente, tales polipéptidos se pueden utilizar para procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

- 20 Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico del polipéptido que ha sido marcado con un radical de formación de imágenes detectable apropiado, tal como un radioisótopo (por ejemplo, ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), una sustancia radio-opaca, o un material detectable mediante resonancia magnética nuclear, es introducido (por ejemplo, parenteralmente, subcutáneamente o intraperitonealmente) en el mamífero que va a ser examinado para determinar un trastorno. Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de formación de imágenes utilizado
25 determinarán la cantidad de radical de formación de imágenes necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un radical radioisotópico, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada oscilará normalmente entre aproximadamente 5 y 20 milicuries de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La proteína de fusión de albúmina marcada se acumulará a continuación preferentemente en localizaciones del organismo que contienen un polipéptido u otra sustancia que se une a, está unida a, o se asocia con una proteína de fusión de albúmina de la presente invención.
30 La formación de imágenes de tumores *in vivo* se describe en S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)).

- Una de las maneras en las que una proteína de fusión de albúmina de la presente invención se puede marcar detectablemente es mediante la conexión de la misma con una enzima indicadora y la utilización del producto
35 conectado en un inmunoanálisis enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, J.E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL.; Ishikawa, E. et al., (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kigaku Shoin, Tokyo). La enzima indicadora que se une al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferiblemente un
40 sustrato cromogénico, de tal manera que se produzca un radical químico que pueda ser detectado, por ejemplo, por métodos espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas indicadoras que se pueden utilizar para marcar detectablemente el anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfatasa, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparraginas, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa,
45 ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Adicionalmente, la detección se puede completar mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima indicadora. La detección se puede completar mediante comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de un modo similar.

- Las proteínas de fusión de albúmina también se pueden radiomarcarse y utilizar en cualquiera de una variedad de
50 otros inmunoanálisis. Por ejemplo, marcando radiactivamente las proteínas de fusión de albúmina, es posible utilizar las proteínas de fusión de albúmina en un radioinmunoanálisis (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, Marzo, 1986, que se incorpora como referencia a la presente memoria). El isótopo radiactivo se puede detectar por métodos que incluyen, pero no se limitan a, un contador gamma, un contador de centelleo, o autorradiografía.

- 55 Adicionalmente, se conocen en la técnica y se pueden utilizar moléculas quelantes para marcar las proteínas de fusión de Albúmina. Las moléculas quelantes se pueden anclar a proteínas de fusión de Albúmina de la invención para facilitar el marcaje de dicha proteína con iones metálicos incluyendo radionúclidos o marcas fluorescentes. Por ejemplo, véanse Subramanian, R. y Meares, C.F., "Bifunctional Chelating Agents for Radiometal-labeled monoclonal Antibodies" en Cancer Imaging with Radiolabeled Antibodies (D. M. Goldenberg, Ed.) Kluwer Academic Publications,

Boston; Saji, H., "Targeted delivery of radiolabeled imaging and therapeutic agents: bifunctional radiopharmaceuticals". Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 16:209-244 (1999); Srivastava S.C. y Mease R.C., "Progress in research on ligands, nuclides and techniques for labeling monoclonal antibodies". Int. J. Rad. Appl. Instrum. B 18:589-603 (1991); y Liu, S. y Edwards, D.S., "Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals". Bioconjug. Chem. 12:7-34 (2001). Se puede utilizar cualquier quelante que se pueda unir covalentemente a dichas proteínas de fusión de Albúmina de acuerdo con la presente invención. El quelante puede comprender adicionalmente un radical conector que conecte el radical quelante a la proteína de fusión de Albúmina.

En una realización, la proteína de fusión de Albúmina de la invención se ancla a un quelante acíclico tal como ácido dietilentriamino-N,N',N'',N'''-pentaacético (DPTA), análogos de DPTA, y derivados de DPTA. Como ejemplos no limitantes, el quelante puede ser ácido 2-(p-isotiocianatobencil)-6-metildietilentriaminopentaacético(1B4M-DPTA, también conocido como MX-DPTA), ácido 2-metil-6-(rho-nitrobencil)-1,4,7-triazaheptano-N,N',N'',N'''-pentaacético (nitro-1B4M-DTPA o nitro-MX-DTPA); ácido 2-(p-isotiocianatobencil)-ciclohexildietilentriaminopentaacético (CHX-DTPA), o ácido N-[2-amino-3(rho-nitrofenil)propil]-trans-ciclohexano-1,2-diamino-N,N',N'''-pentaacético (nitro-CHX-A-DTPA).

En otra realización, la proteína de fusión de Albúmina de la invención se ancla a un quelante de terpiridina acíclico tal como 6,6"-bis[[N,N',N'',N'''-tetra(carboximetil)amino]metil]-4'-(3-amino-4-metoxifenil)-2,2':6',2"-terpiridina (TMT-amina).

En realizaciones específicas, el quelante macrocíclico que está anclado a la proteína de fusión de Albúmina de la invención es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA). En otras realizaciones específicas, el DOTA está anclado a la proteína de fusión de albúmina de la invención a través de una molécula conectora. Los ejemplos de moléculas conectoras útiles para conjugar DOTA a un polipéptido son comúnmente conocidos en la técnica - véanse, por ejemplo, DeNardo et al., Clin. Cancer Res. 4(10):2483-90, 1998; Peterson et al., Bioconjug. Chem. 10(4):553-7, 1999; y Zimmerman et al., Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, 1999 que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad. Adicionalmente, las Patentes de los Estados Unidos 5.652.361 y 5.756.065, que describen agentes quelantes que se pueden conjugar con anticuerpos, y los métodos para elaborarlos y utilizarlos, se incorporan a la presente como referencia en su totalidad. Aunque las Patentes de los Estados Unidos 5.652.361 y 5.756.065 se centran en la conjugación de agentes quelantes con anticuerpos, un experto en la técnica podría adaptar fácilmente el método allí descrito con el fin de conjugar los agentes quelantes con otros polipéptidos.

Los quelantes bifuncionales basados en ligandos macrocíclicos en los que la conjugación es a través de un brazo activado, o un grupo funcional, anclado a la cadena principal carbonada del ligando, se pueden emplear como describen M. Moi et al., J. Amer. Chem. Soc. 49:2639 (1989) (ácido 2-p-nitrobencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético); S. V. Deshpande et al., J. Nucl. Med. 31:473 (1990); G. Ruser et al., Bioconj. Chem. 1:345 (1990); C. J. Broan et al., J. C. S. Chem. Comm. 23:1739 (1990); y C. J. Anderson et al., J. Nucl. Med. 36:850 (1995).

En una realización, se ancla un quelante macrocíclico, tal como quelantes poliazamacrocíclicos, que contienen opcionalmente uno o más grupos carboxi, amino, hidroxamato, fosfonato, o fosfato, a la proteína de fusión de Albúmina de la invención. En otra realización, el quelante es un quelante seleccionado del grupo que consiste en DOTA, análogos de DOTA, y derivados de DOTA.

En una realización, las moléculas quelantes adecuadas que se pueden anclar a la proteína de fusión de Albúmina de la invención incluyen DOXA (ácido 1-oxa-4,7,10-triazaciclododecanotriacético), NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononotriacético), TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecanotetraacético), y THT (4'-(3-amino-4-metoxi-fenil)-6,6"-bis(N',N'-dicarboximetil-N-metilhidrazino)-2,2':6',2"-terpiridina), y análogos y derivados de los mismos. Véanse, p. ej., Ohmono et al., J. Med. Chem. 35: 157-162 (1992); Kung et al., J. Nucl. Med. 25: 326-332 (1984); Jurisson et al., Chem. Rev. 93:1137-1156 (1993); y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.367.080. Otros quelantes adecuados incluyen agentes quelantes descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.647.447; 4.687.659; 4.885.363; los documentos EP-A-71564; WO89/00557; y EP-A-232751.

En otra realización, los quelantes de ácido carboxílico macrocíclicos adecuados que se pueden utilizar en la presente invención incluyen ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA); ácido 1,4,8,12-tetraazaciclopentadecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (15N4); ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N"-triacético (9N3); ácido 1,5,9-triazaciclododecano-N,N',N"-triacético (12N3); y ácido 6-bromoacetamido-bencil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (BAT).

Un quelante preferido que se puede anclar a la proteína de Fusión de Albúmina de la invención es el ácido α -(5-isotiocianato- 2-metoxifenil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético, que también es conocido como MeO-DOTA-NCS. También se puede utilizar una sal o éster de ácido α -(5-isotiocianato- 2-metoxifenil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención a las que se anclan covalentemente quelantes tales como los descritos se pueden marcar (a través del sitio de coordinación del quelante) con radionúclidos que son adecuados

5 para fines terapéuticos, de diagnóstico, o tanto terapéuticos como de diagnóstico. Los ejemplos de los metales apropiados incluyen Ag, At, Au, Bi, Cu, Ga, Ho, In, Lu, Pb, Pd, Pm, Pr, Rb, Re, Rh, Sc, Sr, Tc, Tl, Y, y Yb. Los ejemplos del radionúclido utilizado para fines de diagnóstico son Fe, Gd, ^{111}In , ^{67}Ga , o ^{68}Ga . En otra realización, el radionúclido utilizado con fines de diagnóstico es ^{111}In , o ^{67}Ga . Los ejemplos del radionúclido utilizado con fines terapéuticos son ^{166}Ho , ^{165}Dy , ^{90}Y , $^{115\text{m}}\text{In}$, ^{52}Fe , o ^{72}Ga . En una realización, el radionúclido utilizado con fines de diagnóstico es ^{166}Ho o ^{90}Y . Los ejemplos de los radionúclidos utilizados para fines tanto terapéuticos como de diagnóstico incluyen ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{175}Yb , o ^{47}Sc . En una realización, el radionúclido es ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{175}Yb , o ^{159}Gd .

10 Los radionúclidos metálicos preferidos incluyen ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{41}Sc , ^{67}Ga , ^{51}Cr , $^{177\text{m}}\text{Sn}$, ^{67}Cu , ^{167}Tm , ^{97}Ru , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{199}Au , ^{47}Sc , ^{67}Ga , ^{51}Cr , $^{177\text{m}}\text{Sn}$, ^{67}Cu , ^{167}Tm , ^{95}Ru , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{199}Au , ^{203}Pb y ^{141}Ce .

En una realización concreta, las proteínas de fusión de Albúmina de la invención a las cuales están anclados covalentemente los quelantes pueden estar marcadas con un ión metálico seleccionado del grupo que consiste en ^{90}Y , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{215}Bi , y ^{225}Ac .

15 Por otra parte, los radionúclidos emisores de γ , tales como $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{67}Ga , y ^{169}Yb han sido aprobados o están bajo investigación para la formación de imágenes de diagnóstico, mientras los emisores de β , tales como ^{67}Cu , ^{111}Ag , ^{186}Re , y ^{90}Y son útiles para las aplicaciones en terapia de tumores. Asimismo otros radionúclidos útiles incluyen emisores de γ , tales como $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{67}Ga , y ^{169}Yb , y emisores de β , tales como ^{67}Cu , ^{111}Ag , ^{186}Re , ^{188}Re y ^{90}Y , así como otros radionúclidos de interés tales como ^{211}At , ^{212}Bi , ^{177}Lu , ^{86}Rb , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{198}Au , ^{149}Pm , ^{83}Sr , ^{142}Pr , ^{214}Pb , ^{109}Pd , ^{166}Ho , ^{208}Tl , y ^{44}Sc . Las proteínas de fusión de albúmina de la invención a las cuales se anclan covalentemente quelantes pueden estar marcadas con los radionúclidos descritos más arriba.

20 En otra realización, las proteínas de fusión de Albúmina de la invención a las cuales están unidos covalentemente los quelantes pueden estar marcadas con iones metálicos paramagnéticos que incluyen iones de transición y metales lantánidos, tales como metales que tienen números atómicos de 21-29, 42, 43, 44, o 57-71, en particular iones de Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, y Lu. Los metales paramagnéticos utilizados en composiciones para la formación de imágenes por resonancia magnética incluyen los elementos que tienen números atómicos de 22 a 29, 42, 44 y 58-70.

En otra realización, las proteínas de fusión de Albúmina de la invención a las cuales se anclan covalentemente los quelantes se pueden marcar con iones metálicos fluorescentes incluyendo lantánidos, en particular La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu (p. ej., ^{152}Eu), Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, y Lu.

30 En otra realización, las proteínas de fusión de Albúmina de la invención a las cuales se anclan covalentemente los quelantes se pueden marcar con indicadores que contienen metales pesados que pueden incluir átomos de Mo, Bi, Si, y W.

35 También es posible marcar las proteínas de fusión de albúmina con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente se expone a luz de longitud de onda apropiada, su presencia se puede detectar debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcaje fluorescente más comúnmente utilizados se encuentran isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, ftaldehído y fluorescamina.

40 La proteína de fusión de albúmina también se puede marcar detectablemente utilizando metales que emiten fluorescencia tales como ^{152}Eu , u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden anclar al anticuerpo utilizando grupos quelantes metálicos como ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) o ácido etilendiamintetraacético (EDTA).

45 Las proteínas de fusión de albúmina también se pueden marcar detectablemente acoplándolas a un compuesto quimioluminiscente. La presencia de la proteína de fusión de albúmina etiquetada con quimioluminiscente se determina a continuación detectando la presencia de luminiscencia que se produce durante el curso de una reacción química. Los ejemplos de los compuestos de marcaje luminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.

50 Del mismo modo, se puede utilizar un compuesto bioluminiscente para marcar las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrado en sistemas biológicos, en el que una proteína catalítica incrementa la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes con fines de marcaje son la luciferina, la luciferasa y la aequorina.

Organismos transgénicos

55 Los organismos transgénicos que expresan las proteínas de fusión de albúmina de la invención también están incluidos en la invención. Los organismos transgénicos son organismos modificados genéticamente a los cuales se ha transferido material genético exógeno o clonado, recombinante. Semejante material genético es referido a menudo como transgén. La secuencia de ácido nucleico del transgén puede incluir una o más secuencias

reguladoras de la transcripción y otras secuencias de ácido nucleico tales como intrones, que pueden ser necesarias para la expresión y secreción óptimas de la proteína codificada. El transgén se puede diseñar para dirigir la expresión de la proteína codificada de una manera que facilite su recuperación del organismo o de un producto producido por el organismo, p. ej., de leche, sangre, orina, huevos, pelo o semillas del organismo. El transgén puede consistir en secuencias de ácido nucleico derivadas del genoma de la misma especie o de una especie diferente que la especie del animal diana. El transgén se puede integrar o bien en un locus de un genoma donde esa secuencia de ácido nucleico concreta no se encuentra normalmente de otra manera o en el locus normal para el transgén.

El término "organismo transgénico para una línea celular germinal" hace referencia a un organismo transgénico en el que la alteración genética o la información genética fue introducida en una célula de la línea germinal, confiriendo de ese modo la capacidad del organismo transgénico para transferir la información genética a los vástagos. Si semejantes vástagos poseen de hecho alguna o toda esa información genética, también son organismos transgénicos. La alteración o la información genética pueden ser foráneas para la especie de organismo a la que pertenece el receptor, foráneas solamente para el receptor individual concreto, o puede ser información genética ya poseída por el receptor. En el último caso, el gen introducido o alterado puede ser expresado de manera diferente al gen nativo.

Un organismo transgénico puede ser un animal transgénico o una planta transgénica. Los animales transgénicos pueden ser producidos por una variedad de métodos diferentes incluyendo transfección, electroporación, microinyección, direccionamiento génico en células madre embrionarias e infección viral y retroviral recombinante (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.736.866; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.602.307; Mullins et al. (1993) *Hypertension* 22(4):630-633; Brenin et al. (1997) *Surg. Oncol.* 6(2):99-110; Tuan (ed.), *Recombinant Gene Expression Protocols, Methods in Molecular Biology* No. 62, Humana Press (1997)). El método de introducción de fragmentos de ácido nucleico en células de mamífero de recombinación competente puede ser cualquier método que favorezca la transformación simultánea de múltiples moléculas de ácido nucleico. Los procedimientos detallados para producir animales transgénicos son fácilmente asequibles para un experto en la técnica, incluyendo las descripciones de la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.489.743 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.602.307.

Se han producido numerosos ratones recombinantes o transgénicos, incluyendo aquellos que expresan una secuencia de oncogén activo (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.736.866); expresan el antígeno T de SV40 de simios (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.728.915); carecen de la expresión del factor regulador 1 de interferón (IRF-1) (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.731.490); muestran una disfunción dopaminérgica (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.723.719); expresan al menos un gen humano que participa en el control de la presión sanguínea (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.731.489); presentan mayor similitud con afecciones que existen en la enfermedad de Alzheimer natural (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.720.936); tienen una capacidad reducida para mediar la adherencia celular (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.602.307); poseen un gen de hormona de crecimiento bovina (Clutter et al. (1996) *Genetics* 143(4):1753-1760); o, son capaces de generar una respuesta de anticuerpos completamente humana (McCarthy (1997) *The Lancet* 349(9049):405).

Si bien los ratones y ratas siguen siendo los animales de elección para la mayor parte de la experimentación con transgénicos, en algunos casos es preferible, o incluso necesario, utilizar especies de animales alternativas. Los procedimientos transgénicos han sido utilizados satisfactoriamente en una variedad de animales no murinos, incluyendo ovejas, cabras, cerdos, perros, gatos, monos, chimpancés, hámsters, conejos, vacas y cobayas (véase, p. ej., Kim et al. (1997) *Mol. Reprod. Dev.* 46(4):515-526; Houdebme (1995) *Keprod. Nutr. Dev.* 35(6):609-617; Petters (1994) *Reprod. Fertil. Dev.* 6(5):643-645; Schnieke et al. (1997) *Science* 278(5346):2130-2133; y Amoah (1997) *J. Animal Science* 75(2):578-585).

Para dirigir la secreción de la proteína codificada por un transgén de la invención a la leche de mamíferos transgénicos, se puede poner bajo el control de un promotor que está activado preferentemente en células epiteliales mamarias. Se prefieren los promotores que controlan los genes que codifican las proteínas de la leche, por ejemplo el promotor para caseína, beta lactoglobulina, proteína ácida del suero, o lactoalbumina (véanse, p. ej., DiTullio (1992) *BioTechnology* 10:74-77; Clark et al. (1989) *BioTechnology* 7:487-492; Gorton et al. (1987) *BioTechnology* 5:1183-1187; y Soulier et al. (1992) *FEBS Letts.* 297: 13). Los mamíferos transgénicos de elección producirían grandes volúmenes de leche y tendrían períodos de lactancia prolongados, por ejemplo cabras, camellos u ovejas.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención también puede ser expresada en una planta transgénica, p. ej., una planta en la que el transgén de ADN se inserta en el genoma nuclear o plastídico. Los procedimientos de transformación de plantas utilizados para introducir ácidos nucleicos foráneos en células vegetales o protoplastos son conocidos en la técnica. Véanse, en general, *Methods in Enzymology* Vol. 153 ("Recombinant DNA Part D") 1987, Wu y Grossman Eds., Academic Press y Solicitud de Patente Europea EP 693554. Los métodos para la generación de plantas modificadas genéticamente se describen adicionalmente en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.283.184, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.482.852, y la Solicitud de Patente Europea EP 693 554, todas las cuales se incorporan a la presente como referencia.

Composiciones farmacéuticas o terapéuticas

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención o las formulaciones de las mismas se pueden administrar mediante cualquier método convencional incluyendo la inyección parenteral (p. ej., subcutánea o intramuscular) o la infusión intravenosa. El tratamiento puede consistir en una única dosis o una pluralidad de dosis a lo largo de un período de tiempo.

Si bien es posible administrar sola una proteína de fusión de albúmina de la invención, es preferible presentarla como una formulación farmacéutica, junto con uno o más portadores aceptables. El portador o los portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con la proteína de fusión de albúmina y no perjudiciales para los receptores de los mismos. Típicamente, los portadores serán agua o solución salina que serán estériles y estarán libres de pirógenos. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención son particularmente adecuadas para la formulación en portadores acuosos tales como agua estéril libre de pirógenos, solución salina u otras soluciones isotónicas debido a su larga vida útil en solución. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular bien de antemano en forma acuosa, por ejemplo, semanas o meses o períodos de tiempo más largos antes de ser dispensadas.

Por ejemplo, las formulaciones que contienen la proteína de fusión de albúmina se pueden preparar tomando en consideración la prolongada vida útil de la proteína de fusión de albúmina en formulaciones acuosas. Como se ha comentado anteriormente, la vida útil de muchas de estas proteínas Terapéuticas aumenta notablemente o se prolonga después de la fusión con HA.

En los casos en los que la administración de aerosol es apropiada, las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden formular en forma de aerosoles utilizando procedimientos convencionales. El término "aerosol" incluye cualquier fase en suspensión gaseosa de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención que sea susceptible de ser inhalada hacia los bronquiolos o canales nasales. Específicamente, el aerosol incluye una suspensión de gotitas de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención en suspensión gaseosa, como la que se puede producir en un inhalador o nebulizador de dosis medida, o en un pulverizador de rocío. El aerosol también incluye una composición de polvo seco de un compuesto de la presente invención suspendido en aire u otro gas portador, que puede ser liberado por insuflación desde un dispositivo inhalador, por ejemplo. Véanse Ganderton & Jones, *Drug Delivery to the Respiratory Tract*. Ellis Horwood (1987); Gonda (1990) *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 6:273-313; y Raeburn et al., (1992) *Pharmacol. Toxicol. Methods* 27:143-159.

Las formulaciones de la invención también son típicamente no inmunogénicas, en parte, debido al uso de los componentes de la proteína de fusión de albúmina que están derivados de la especie apropiada. Por ejemplo, para su uso en seres humanos, tanto la proteína Terapéutica como las porciones de albúmina de la proteína de fusión de albúmina serán típicamente humanas. En algunos casos, en donde cualquiera de los componentes no está derivado de ser humano, ese componente puede ser humanizado mediante sustitución de aminoácidos clave de manera que epítopos específicos se manifiesten como humanos al sistema inmunitario humano en lugar de como foráneos.

Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Tales métodos incluyen la etapa de asociar la proteína de fusión de albúmina con el portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si fuera necesario, conformando el producto.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación apropiada para el receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas o no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis únicas o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas selladas, viales o jeringas, y se pueden almacenar en condiciones de secado por congelación (liofilizadas) que requieren solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles. Las formulaciones de dosificación pueden contener la porción de proteína Terapéutica a una concentración molar inferior o una dosificación inferior en comparación con la formulación convencional no fusionada para la proteína Terapéutica dada la vida media en suero ampliada que muestran muchas de las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Como ejemplo, la proteína de fusión de albúmina de la invención comprende la proteína enumerada en la columna "Proteína Terapéutica: X" de la Tabla 1 como una o más de las regiones de proteína Terapéutica, la forma de dosificación se puede calcular basándose en la potencia de la proteína de fusión de albúmina con respecto a la potencia de la proteína terapéutica sola, a la vez que se tiene en cuenta la vida media en suero y la vida útil prolongada de las proteínas de fusión de albúmina en comparación con la de la proteína terapéutica nativa. Por ejemplo, si la proteína terapéutica se administra típicamente a 0,3 a 30,0 UI/kg/semana, o 0,9 a 12,0 UI/kg/semana, administrada en tres o siete dosis divididas durante un año o más. En una proteína de fusión de albúmina que consiste en HA completa fusionada a una proteína terapéutica, una dosis equivalente en términos de unidades

representaría un mayor peso de agente pero la frecuencia de dosificación se podría reducir, por ejemplo a dos veces por semana, una vez por semana o menos.

Las formulaciones o composiciones de la invención se pueden empaquetar junto con, o incluídas en un kit con, instrucciones o un prospecto referente a la vida útil prolongada del componente de proteína de fusión de albúmina. Por ejemplo, tales instrucciones o prospectos pueden tratar sobre las condiciones de almacenamiento recomendadas, tales como tiempo, temperatura y luz, teniendo en cuenta la vida útil ampliada o prolongada de las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Tales instrucciones o prospectos también pueden tratar sobre las ventajas particulares de las proteínas de fusión de albúmina de la invención, tales como la facilidad de almacenamiento para las formulaciones que puede requerir el uso en condiciones sobre el terreno, fuera del hospital controlado, clínicas o en el despacho. Como se ha descrito anteriormente, las formulaciones de la invención pueden estar en forma acuosa y se pueden almacenar en circunstancias por debajo de las ideales sin una pérdida significativa de actividad terapéutica.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden incluir en nutracéuticos. Por ejemplo, ciertas proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden administrar en productos naturales, incluyendo leche o producto lácteo obtenido de un mamífero transgénico que expresa la proteína de fusión de albúmina. Tales composiciones también pueden incluir plantas o productos vegetales obtenidos de una planta transgénica que expresa la proteína de fusión de albúmina. La proteína de fusión de albúmina también se puede proporcionar en forma de polvo o comprimido, con o sin otros aditivos, portadores, cargas y diluyentes conocidos. Los nutracéuticos son descritos por Scott Hegenhart, Food Product Design, Dic. 1993.

La invención también proporciona métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos (tales como, por ejemplo, uno o más cualesquiera de las enfermedades o trastornos descritos en la presente memoria) mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una proteína de fusión de albúmina de la invención o un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención ("polinucleótido de fusión de albúmina") en un portador farmacéuticamente aceptable.

La proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina se formularán y dosificarán de una manera compatible con la buena práctica médica, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual (especialmente los efectos secundarios del tratamiento con la proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina solos), el lugar del suministro, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad eficaz" para los fines de la presente memoria se determina de ese modo mediante tales consideraciones.

Como proposición general, la cantidad farmacéuticamente eficaz total de la proteína de fusión de albúmina administrada parenteralmente por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día de peso corporal de paciente, aunque, como se ha observado anteriormente, estará sujeta a la discreción terapéutica. Más preferiblemente, esta dosis es de al menos 0,01 mg/kg/día, y muy preferiblemente para seres humanos entre aproximadamente 0,01 y 1 mg/kg/día para la hormona. Si se administra continuamente, la proteína de fusión de albúmina se administra típicamente a una tasa de dosificación de aproximadamente 1 µg/kg/hora a aproximadamente 50 µg/kg/hora, o bien mediante 1-4 inyecciones por día o bien mediante infusiones subcutáneas continuas, por ejemplo, utilizando una mini-bomba. También se puede emplear una solución en bolsa intravenosa. La longitud del tratamiento necesaria para observar cambios y el intervalo después del tratamiento para que se produzcan las respuestas parecen variar dependiendo del efecto deseado.

Como se ha observado anteriormente, la proteína de fusión de albúmina de la invención tiene una estabilidad en plasma mayor en comparación con la porción de proteína Terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma) sola. Este incremento en la estabilidad en plasma se debe tener en cuenta cuando se determinan la cantidad eficaz de la proteína de fusión de albúmina que se va a administrar por dosis y el programa de administración de las dosis. En particular, la mayor estabilidad en plasma puede permitir que la proteína de fusión de albúmina sea administrada a una dosis inferior a la misma frecuencia de administraciones, o alternativamente, puede permitir que la proteína de fusión de albúmina sea administrada a dosis inferiores. Preferiblemente, la mayor estabilidad permite que la proteína de fusión de albúmina de la invención sea administrada menos a menudo en menos dosis. Más preferiblemente, la proteína de fusión de albúmina se puede administrar una vez cada dos semanas. Aún más preferiblemente, la proteína de fusión de albúmina se puede administrar una vez cada tres, cuatro, cinco, o más semanas dependiendo de la farmacocinética de la proteína de fusión de albúmina. Por ejemplo, como se ha comentado anteriormente, la farmacocinética de una proteína de fusión de IFN-alfa-HSA apoya un régimen de dosificación de una vez cada 2-4 semanas o más, e incluso una dosificación a intervalos de 4 semanas o más de cada 4 semanas.

Las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de Albúmina se pueden administrar oralmente, rectalmente, parenteralmente, intracisternalmente, intravaginalmente, intraperitonealmente, tópicamente (como polvos, pomadas, geles, gotas o parches transdérmicos), bucalmente, o como una pulverización oral o nasal. "Portador farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una carga, diluyente, material encapsulante o coadyuvante de formulación de cualquier tipo sólido, semisólido o líquido no tóxico. El término "parenteral" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a modos de administración que incluyen la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

Las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención también se administran adecuadamente por medio de sistemas de liberación sostenida. Los ejemplos de las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de liberación sostenida se administran oralmente, rectalmente, parenteralmente, intracisternalmente, intravaginalmente, intraperitonealmente, tópicamente (como polvos, pomadas, geles, gotas, o parches transdérmicos), bucalmente, o como una pulverización oral o nasal. "Portador farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una carga, diluyente, material encapsulante o coadyuvante de formulación de cualquier tipo sólido, semisólido o líquido no tóxico. El término "parenteral" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a los modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular. Los ejemplos adicionales de las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de liberación sostenida incluyen materiales poliméricos adecuados (tales como, por ejemplo, matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas), materiales hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, y derivados escasamente solubles (tales como, por ejemplo, una sal escasamente soluble).

Las matrices de liberación sostenida incluyen polilactidas (Patente de los Estados Unidos Núm. 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers 22:547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981), y Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)), vinilacetato de etileno (Langer et al., Id.) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988).

Las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de liberación sostenida también incluyen proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención atrapados lisosomalmente (véanse en general, Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 317 -327 y 353-365 (1989)). Los liposomas que contienen la proteína y/o polinucleótido de fusión de albúmina se preparan mediante métodos conocidos per se: documento DE 3.218.121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4030-4034 (1980); documento EP 52,322; documento EP 36,676; documento EP 88,046; documento EP 143,949; documento EP 142,641; Solicitud de Patente Japonesa 83-118008; Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. Habitualmente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en el que el contenido de lípido es mayor de aproximadamente 30 por ciento en moles de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para una Terapia óptima.

En otra realización adicional más, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se liberan por medio de una bomba (véanse, Langer, más arriba; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)).

Otros sistemas de liberación controlada se comentan en la revisión de Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

Para la administración parenteral, en una realización, la proteína y/o polinucleótido de fusión de albúmina se formulan generalmente mezclándolos con el grado de pureza deseado, en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, o emulsión), con un portador farmacéuticamente aceptable, esto es, uno que no es tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. Por ejemplo, la formulación preferiblemente no incluye agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son perjudiciales para la Terapia.

Generalmente, las formulaciones se preparan poniendo en contacto la proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina uniformemente e íntimamente con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos. A continuación, si fuera necesario, el producto se conforma en la formulación deseada. Preferiblemente el portador es un portador parenteral, más preferiblemente una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Los ejemplos de tales vehículos portadores incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, y solución de dextrosa. Los vehículos no acuosos tales como los aceites fijados y el oleato de etilo también son útiles en la presente memoria, así como los liposomas.

El portador contiene adecuadamente cantidades minoritarias de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química. Tales materiales no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético, y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), p. ej., poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y oros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (incluyendo, por ejemplo, Tween-20), poloxámeros, o PEG.

La proteína de fusión de albúmina se formula típicamente en tales vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente 1-10 mg/ml, a un pH de aproximadamente 3 a 8. Se entenderá que el uso de algunos de los excipientes, portadores, o estabilizadores anteriores dará como resultado la

formación de sales de polipéptidos.

Cualquier fármaco utilizado para la administración terapéutica puede ser estéril. La esterilidad se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles (p. ej., membranas de 0,2 micras). Las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina normalmente se almacenarán en recipientes de dosis unitarias o múltiples, por ejemplo, ampollas o viales sellados, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para su reconstitución. Como ejemplo de una formulación liofilizada, se cargan viales de 10 ml con 5 ml de solución de proteína y/o polinucleótido de fusión de albúmina acuosa filtrada en condiciones estériles al 1% (p/v), y la mezcla resultante se liofiliza. La solución de infusión se prepara reconstituyendo la proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina liofilizados utilizando agua para inyectables bacteriostática.

En una realización específica y preferida, las formulaciones de proteína de fusión de Albúmina comprenden fosfato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,15 mM, 0,16 micromoles de octanoato de sodio/miligramo de proteína de fusión, 15 microgramos/mililitro de polisorbato 80, pH 7,2. En otra realización específica y preferida, las formulaciones de proteína de fusión de Albúmina consisten en fosfato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,15 mM, 0,16 micromoles de octanoato de sodio/miligramo de proteína de fusión, 15 microgramos/mililitro de polisorbato 80, pH 7,2. El pH y el tampón se seleccionan para que coincidan con las condiciones fisiológicas y la sal se añade como agente de tonicidad. Se ha elegido octanoato de sodio debido a su habilidad reconocida para incrementar la estabilidad térmica de la proteína en la solución. Finalmente, se ha añadido polisorbato como tensioactivo genérico, que disminuye la tensión superficial de la solución y disminuye la adsorción no específica de la proteína de fusión de albúmina al sistema de cierre del recipiente.

La invención también proporciona un paquete o kit que comprende uno o más recipientes cargados con uno o más de los ingredientes de las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención. Asociada con tales recipientes puede haber una comunicación en la forma prescrita por la agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de los fármacos o productos biológicos, cuya comunicación refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para la administración a seres humanos. Adicionalmente, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina se pueden emplear junto con otros compuestos terapéuticos.

Las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se pueden administrar solos o combinados con coadyuvantes. Los coadyuvantes que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, alumbre, alumbre más desoxicolato (ImmunoAg), MTP-PE (Biocine Corp.), QS21 (Genentech, Inc.), BCG (p. ej., THERACYS®), MPL y preparaciones no viables de *Corynebacterium parvum*. En una realización específica, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con alumbre. En otra realización específica, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con QS-21. Otros coadyuvantes que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, inmunomodulador de Monofosforil lípido, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, sales de Aluminio, MF-59, y tecnología de coadyuvante Virosomal. Las vacunas que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, vacunas dirigidas a la protección contra MMR (sarampión, paperas, rubeola), polio, varicela, tétanos/difteria, hepatitis A, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* B, tos convulsiva, pneumonia, influenza, Enfermedad de Lyme, rotavirus, cólera, fiebre amarilla, encefalitis Japonesa, poliomieltitis, rabia, fiebre tifoidea, y pertussis. Las combinaciones se pueden administrar concomitantemente, p. ej., en forma de una mezcla, por separado pero simultáneamente o concurrentemente; o sucesivamente. Esto incluye presentaciones en las que los agentes combinados se administran juntos como una mezcla terapéutica, y también procedimientos en los que los agentes combinados se administran por separado pero simultáneamente, p. ej., por medio de líneas intravenosas separadas en el mismo individuo. La administración "combinada" incluye adicionalmente la administración separada de uno de los compuestos o agentes proporcionados primero, seguida del segundo.

Las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se pueden administrar solos o combinados con otros agentes terapéuticos. Los agentes de proteína y/o polinucleótido de fusión de albúmina que se pueden administrar combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención, incluyen pero no se limitan a, agentes quimioterapéuticos, antibióticos, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes inmunoterapéuticos convencionales, y/o tratamientos terapéuticos descritos más abajo. Las combinaciones se pueden administrar concomitantemente, p. ej., en forma de una mezcla, por separado pero simultáneamente o concurrentemente; o secuencialmente. Esto incluye presentaciones en las que los agentes combinados se administran juntos como una mezcla terapéutica, y también procedimientos en los que los agentes combinados se administran por separado pero simultáneamente, p. ej., por medio de líneas intravenosas separadas al mismo individuo. La administración "combinada" incluye adicionalmente la administración separada de uno de los compuestos o agentes proporcionado primero, seguida del segundo.

En una realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran

combinados con un anticoagulante. Los anticoagulantes que se pueden administrar con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, heparina, heparina de bajo peso molecular, warfarina sódica (p. ej., COUMADIN®), dicumarol, 4-hidroxycoumarina, anisindiona (p. ej., MIRADON™), acenocumarol (p. ej., nicoumalonea SINTHROME™), indan-1,3-diona, fenprocumon (p. ej., MARCUMAR™), biscoumacetato de etilo (p. ej., TROMEXAN™), y aspirina. En una realización específica, las composiciones de la invención se administran combinadas con heparina y/o warfarina. En otra realización específica, las composiciones de la invención se administran combinadas con warfarina. En otra realización específica, las composiciones de la invención se administran combinadas con warfarina y aspirina. En otra realización específica, las composiciones de la invención se administran combinadas con heparina. En otra realización específica, las composiciones de la invención se administran combinadas con heparina y aspirina.

En otra realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con fármacos trombolíticos. Los fármacos trombolíticos que se pueden administrar con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, plasminógeno, lys-plasminógeno, alfa2-antiplasmina, estreptoquinasa (p. ej., KABIKINASE™), anistreplasa (p. ej., EMINASE™), activador de plasminógeno tisular (t-PA, altevasa, ACTIVASE™), uroquinasa (p. ej., ABBOKINASE™), sauruplasa, (Prourokinase, uroquinasa de cadena sencilla), y ácido aminocaproico (p. ej., AMICAR™). En una realización específica, las composiciones de la invención se administran combinadas con activador de plasminógeno tisular y aspirina.

En otra realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con fármacos antiplaquetarios. Los fármacos antiplaquetarios que se pueden administrar con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, aspirina, dipiridamol (p. ej., PERSANTINE™), y ticlopidina (p. ej., TICLID™).

En realizaciones específicas, el uso de fármacos anti-coagulantes, trombolíticos y/o antiplaquetarios combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se contempla para la prevención, el diagnóstico, y/o el tratamiento de trombosis, trombosis arterial, trombosis venosa, tromboembolia, embolia pulmonar, aterosclerosis, infarto de miocardio, ataque isquémico transitorio, angina inestable. En realizaciones específicas, el uso de fármacos anticoagulantes, trombolíticos y/o fármacos antiplaquetarios combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se contempla para la prevención de la oclusión de injertos de la vena safena, para reducir el riesgo de trombosis periprocedimental que podría acompañar los procedimientos de angioplastia, para reducir el riesgo de accidente cerebrovascular en pacientes con fibrilación atrial incluyendo fibrilación atrial no reumática, para reducir el riesgo de embolia asociado con enfermedad de las válvulas cardíacas mecánicas y/o las válvulas mitrales. Otros usos para los agentes terapéuticos de la invención, solos o combinados con fármacos antiplaquetarios, anticoagulantes, y/o trombolíticos, incluyen, pero no se limitan a, la prevención de oclusiones en dispositivos extracorpóreos (p. ej., cánulas intravasculares, derivaciones de acceso vascular en pacientes de hemodiálisis, máquinas de hemodiálisis, y máquinas de bypass cardiopulmonar).

En ciertas realizaciones, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con agentes antirretrovirales, inhibidores nucleosídicos/nucleotídicos de la transcriptasa inversa (NRTI), inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NNRTI), y/o inhibidores de proteasa (PI). Los NRTI que se pueden administrar combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, RETROVIR™ (zidovudina/AZT), VIDEX™ (didanosina/ddI), HIVID™ (zalcitabina/ddC), ZERIT™ (estavudina/d4T), EPIVIR™ (lamivudina/3TC), y COMBIVIR™ (zidovudina/lamivudina). Los NNRTI que se pueden administrar combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, VIRAMUNE™ (nevirapina), RESCRIPTOR™ (delavirdina), y SUSTIVA™ (efavirenz). Los inhibidores de proteasa que se pueden administrar combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, CRIXIVAN™ (indinavir), NORVIR™ (ritonavir), INVIRASE™ (saquinavir), y VIRACEPT™ (nelfinavir). En una realización específica, se pueden utilizar agentes antirretrovirales, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, y/o inhibidores de proteasa en cualquier combinación con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención para tratar el SIDA y/o para prevenir o tratar la infección por VIH.

Otros NRTI incluyen LODENOSINE™ (F-ddA; un NRTI de adenosina estable frente a los ácidos; Triangle/Abbott; COVIRACIL™ (emtricitabina/FTC; estructuralmente relacionado con lamivudina (3TC) pero con una actividad *in vitro* 3- a 10-veces mayor; Triangle/Abbott); dOTC (BCH-10652, también relacionado estructuralmente con lamivudina pero conserva actividad contra una proporción sustancial de productos aislados resistentes a lamivudina; Biochem Pharma); **Adefovir** (aprobación denegada para la terapia anti-VIH por la FDA; Gilead Sciences); PREVEON® (Adefovir Dipivoxil, el profármaco activo de adefovir; su forma activa es PME-pp); **TENOFOVIR™** (bis-POC PMPA, un profármaco de PMPA; Gilead); **DAPD/DXG** (metabolito activo de DAPD; Triangle/Abbott); **D-D4FC** (relacionado con 3TC, con actividad contra virus resistentes a AZT/3TC); **GW420867X** (Glaxo Wellcome); ZIAGEN™ (abacavir/159U89; Glaxo Wellcome Inc.); CS-87 (3'azido-2',3'-didesoxiuridina; documento WO 99/66936); y formas profármaco que portan S-acil-2-tioetil (SATE) de β-L-FD4C y β-L-FddC (documento WO 98/17281).

Otros NNRTI incluyen COACTINON™ (**Emivirina/MKC-442**, NNRTI potente de la clase HEPT; Triangle/Abbott); **CAPRAVIRINE™** (AG-1549/S-1153, un NNRTI de la siguiente generación con actividad contra virus que contienen la mutación K103N; Agouron); PNU-142721 (tiene una actividad 20 a 50 veces mayor que su predecesor delavirdina

y es activo contra mutantes K103N; Pharmacia & Upjohn); DPC-961 y DPC-963 (derivados de segunda generación de efavirenz, diseñado para que sea activo contra virus con la mutación K103N; DuPont); GW-420867X (tiene una actividad 25 veces mayor que HBY097 y es activo contra mutantes K103N; Glaxo Wellcome); CALANOLIDE A (agente de origen natural del árbol del látex; activo contra virus que contienen cualquiera o ambas de las mutaciones Y181C y K103N); y Propóleos (documento WO 99/49830).

Otros inhibidores de proteasa incluyen **LOPINAVIR**[™] (ABT378/r; Abbott Laboratories); BMS-232632 (un azapéptido; Bristol-Myers Squibb); TIPRANAVIR[™] (PNU-140690, una dihidropirona no peptídica; Pharmacia & Upjohn); PD-178390 (una dihidropirona no peptídica; Parke-Davis); **BMS 232632** (un azapéptido; Bristol-Myers Squibb); L-756,423 (un análogo de indinavir; Merck); DMP-450 (un compuesto de urea cíclica; Avid & DuPont); AG-1776 (un peptidomimético con actividad *in vitro* contra virus resistentes a inhibidores de proteasas; Agouron); **VX-175/CW-433908** (profármaco fosfato de amprenavir; Vertex & Glaxo Wellcome); **CGP61755** (Ciba); y AGENERASE[™] (amprenavir; Glaxo Wellcome Inc.).

Otros agentes antirretrovirales incluyen inhibidores de fusión/aglutinantes de gp41. Los inhibidores de fusión/aglutinantes de gp41 incluyen T-20 (un péptido desde los residuos 643-678 del ectodominio de la proteína transmembrana gp41 de VIH que se une a gp41 en su estado en reposo y evita la transformación al estado fusogénico; Trimeris) y T-1249 (un inhibidor de fusión de segunda generación; Trimeris).

Otros agentes antirretrovirales incluyen inhibidores de fusión/antagonistas de receptores de quimioquinas. Los inhibidores de fusión/antagonistas de receptores de quimioquinas incluyen antagonistas de CXCR4 tales como AMD 3100 (un biciclamo), SDF-1 y sus análogos, y ALX40-4C (un péptido catiónico), T22 (un péptido de 18 aminoácidos; Trimeris) y los análogos de T22 T134 y T140; antagonistas de CCR5 tales como RANTES (9-68), AOP-RANTES, NNY-RANTES, y TAK-779; y antagonistas de CCR5/CXCR4 tales como NSC 651016 (un análogo de distamicina). También se incluyen los antagonistas de CCR2B, CCR3, y CCR6. Los antagonistas de receptores de quimioquinas tales como RANTES, SDF-1, MIP-1 α , MIP-1 β , etc., también pueden inhibir la fusión.

Otros agentes antirretrovirales incluyen inhibidores de integrasa. Los inhibidores de integrasa incluyen ácidos dicafeoilquinicos (DFQA); ácido L-chicórico (un ácido a dicafeoiltartárico (ácido DCTA)); quinalizarina (QLC) y antraquinonas relacionadas; **ZINTEVIR**[™] (AR 177, un oligonucleótido que probablemente actúa en la superficie celular en lugar de ser un inhibidor de integrasa auténtico; Arondex); y naftoles tales como los descritos en el documento WO 98/50347.

Otros agentes antirretrovirales incluyen compuestos de tipo hidroxíurea tales como **BCX-34** (un inhibidor de purina nucleosido fosforilasa; Biocryst); inhibidores de ribonucleótido reductasa tales como **DIDOX**[™] (Molecules for Health); inhibidores de inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) tales como **VX-497** (Vertex); y ácidos micofólicos tales como CellCept (**micofenolato de mofetilo**; Roche).

Otras agentes antirretrovirales incluyen inhibidores de integrasa viral, inhibidores de la translocación nuclear del genoma viral tales como compuestos de arileno bis(metilcetona); inhibidores de la entrada de VIH tales como AOP-RANTES, NNY-RANTES, proteína de fusión de RANTES-IgG, complejos solubles de RANTES y glicosaminoglicanos (GAG), y AMD-3100; inhibidores de dedo de cinc de la nucleocápside tales como compuestos de ditiano; dianas de VIH Tat y Rev; y potenciadores de fármacos tales como ABT-378.

Otras terapias antirretrovirales y terapias complementarias incluyen citoquinas y linfoquinas tales como MIP-1 α , MIP-1 β , SDF-1 α , IL-2, PROLEUKIN (aldesleuquina/L2-7001; Chiron), IL-4, IL-10, IL-12, y IL-13; interferones tales como IFN-alfa2a, IFN-alfa2b, o IFN-beta; antagonistas de TNF, NF κ B, GM-CSF, M-CSF, e IL-10; agentes que modulan la activación inmunitaria tales como ciclosporina y prednisona; vacunas tales como Remune[™] (HIV Immunogen), APL 400-003 (Apollon), gp120 recombinante y fragmentos, glicoproteína de la envoltura recombinante (B/E) bivalente, rgp120CM235, MN rgp120, SF-2 rgp120, complejo de gp120/CD4 soluble, proteína Delta JR-FL, péptido sintético ramificado derivado del dominio C3/C4 de gp120 discontinuo, inmunógenos de fusión competente, y vacunas de Gag, Pol, Nef, y Tat; terapias basadas en genes tales como elementos supresores de genes (GSE; documento WO 98/54366), e intraquinas (quimioquinas CC modificadas genéticamente dirigidas al ER para bloquear la expresión en la superficie de CCR5 recién sintetizado (Yang et al., PNAS 94:11567-72 (1997); Chen et al., Nat. Med. 3:1110-16 (1997)); anticuerpos tales como el anticuerpo anti-CXCR4 12G5, los anticuerpos anti-CCR5 2D7, 5C7, PA8, PA9, PA10, PA11, PA12, y PA14, los anticuerpos anti-CD4 Q4120 y RPA-T4, el anticuerpo anti-CCR3 7B11, los anticuerpos anti-gp120 17b, 48d, 447-52D, 257-D, 268-D y 50.1, anticuerpos anti-Tat, anticuerpos anti-TNF- α , y anticuerpo monoclonal 33A; agonistas y antagonistas del receptor de aril-hidrocarburo (AH) tales como TCDD, 3,3',4,4',5-pentaclorobifenilo, 3,3',4,4'-tetraclorobifenilo, y α -naftoflavona (documento WO 98/30213); y antioxidantes tales como éster etílico de γ -L-glutamyl-L-cisteína (γ -GCE; documento WO 99/56764).

En una realización adicional, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con un agente antiviral. Los agentes antivirales que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, aciclovir, ribavirina, amantadina, remantidina, maxamina, o timalfasina. Específicamente, la proteína de fusión de interferon-albúmina se puede administrar combinada con cualquiera de estos agentes. Por otra parte, la proteína de fusión de interferon alfa-albúmina también se puede administrar con cualquiera de estos agentes, y preferiblemente, la proteína de fusión de

interferon alfa 2a o 2b-albúmina se puede administrar con cualquiera de estos agentes. Además, la proteína de fusión de interferon beta-albúmina también se puede administrar con cualquiera de estos agentes. Adicionalmente, cualquiera de las proteínas de fusión de híbridos de IFN-albúmina se puede administrar combinada con cualquiera de estos agentes.

En una realización muy preferida, la proteína de fusión de interferón-albúmina se administra combinada con ribavirina. En una realización preferida adicional, la proteína de fusión de interferon alfa-albúmina se administra combinada con ribavirina. En una realización preferida adicional, la proteína de fusión de interferon alfa 2a-albúmina se administra combinada con ribavirina. En una realización preferida adicional, la proteína de fusión de interferon alfa 2b-albúmina se administra combinada con ribavirina. En una realización preferida adicional, la proteína de fusión de interferon beta-albúmina se administra combinada con ribavirina. En una realización preferida adicional, la proteína de fusión de híbrido de interferón-albúmina se administra combinada con ribavirina.

En otras realizaciones, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se pueden administrar combinados con agentes anti-infección oportunista. Los agentes anti-opportunistas que se pueden administrar combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE™, DAPSONE™, PENTAMIDINE™, ATOVAQUONE™, ISONIAZID™, RIFAMPIN™, PYRAZINAMIDE™, ETHAMBUTOL™, RIFABUTIN™, CLARITHROMYCIN™, AZITHROMYCIN™, GANCICLOVIR™, FOSCARNET™, CIDOFOVIR™, FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™, KETOCONAZOLE™, ACYCLOVIR™, FAMCICLOVIR™, PYRIMETHAMINE™, LEUCOVORIN™, NEUPOGEN™ (filgrastim/G-CSF), y LEUKINE™ (sargramostim/GM-CSF). En una realización específica, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se utilizan combinados con TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE™, DAPSONE™, PENTAMIDINE™, y/o ATOVAQUONE™ para tratar profilácticamente o prevenir una infección de neumonía por *Pneumocystis carinii* oportunista. En otra realización específica, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se utilizan en cualquier combinación con ISONIAZID™, RIFAMPIN™, PYRAZINAMIDE™, y/o ETHAMBUTOL™ para tratar profilácticamente o prevenir una infección compleja por *Mycobacterium avium* oportunista. En otra realización específica, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se utilizan en cualquier combinación con RIFABUTIN™, CLARITHROMYCIN™, y/o AZITHROMYCIN™ para tratar profilácticamente o prevenir una infección por *Mycobacterium tuberculosis* oportunista. En otra realización específica, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se utilizan en cualquier combinación con GANCICLOVIR™, FOSCARNET™, y/o CIDOFOVIR™ para tratar profilácticamente o prevenir una infección por citomegalovirus oportunista. En otra realización específica, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se utilizan en cualquier combinación con FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™, y/o KETOCONAZOLE™ para tratar profilácticamente o prevenir una infección fúngica oportunista. En otra realización específica, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se utilizan en cualquier combinación con ACYCLOVIR™ y/o FAMCICLOVIR™ para tratar profilácticamente o prevenir una infección por virus herpes simplex tipo I y/o tipo II oportunista. En otra realización específica, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se utilizan en cualquier combinación con PYRIMETHAMINE™ y/o LEUCOVORIN™ para tratar profilácticamente o prevenir una infección por *Toxoplasma gondii* oportunista. En otra realización específica, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se utilizan en cualquier combinación con LEUCOVORIN™ y/o NEUPOGEN™ para tratar profilácticamente o prevenir una infección bacteriana oportunista.

En una realización adicional, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con un agente antibiótico. Los agentes antibióticos que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, amoxicilina, beta-lactamasas, aminoglicosidos, beta-lactama (glicopéptido), beta-lactamasas, Clindamicina, cloramfenicol, cefalosporinas, ciprofloxacina, eritromicina, fluoroquinolonas, macrólidos, metronidazol, penicilinas, quinolonas, rapamicina, rifampina, estreptomina, sulfonamida, tetraciclinas, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol, y vancomicina.

En otras realizaciones, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con inmunoestimuladores. Los inmunoestimuladores que se pueden administrar combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, levamisol (p. ej., ERGAMISOL™), isoprinosina (p. ej., INOSIPLEX™), interferones (p. ej., interferon alfa), e interleuquinas (p. ej., IL-2).

En otras realizaciones, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con agentes inmunosupresores. Los agentes inmunosupresores que se pueden administrar combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, esteroides, ciclosporina, análogos de ciclosporina, ciclofosfamida metilprednisona, prednisona, azatioprina, FK-506, 15-desoxiespergualina, y otros agentes inmunosupresores que actúan suprimiendo la función de las células T correspondientes. Otros agentes inmunosupresores que se pueden administrar combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, prednisolona, metotrexato, talidomida, metoxsalen, rapamicina, leflunomida, mizoribina (BREDININ™), brequinar, desoxiespergualina, y azaspirano (SKF 105685), ORTHOCLONE OKT® 3 (muromonab-CD3), SANDIMMUNE™, NEORAL™, SANGDYA™ (ciclosporina), PROGRAF® (FK506, tacrolimus), CELLCEPT® (micofenolato mofetilo, del cual el metabolito activo es el ácido micofenólico), IMURAN™ (azatioprina), glucocorticosteroides, esteroides

adrenocorticales tales como DELTASONE™ (prednisona) e HYDELTRASOL™ (prednisolona), FOLEX™ y MEXATE™ (metotrexato), OXSORALEN-ULTRA™ (metoxsalen) y RAPAMUNE™ (sirolimus). En una realización específica, los inmunosupresores se pueden utilizar para prevenir el rechazo de órganos o el trasplante de médula ósea.

- 5 En una realización adicional, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran solos o combinados con una o más preparaciones intravenosas de inmunoglobulina. Las preparaciones intravenosas de inmunoglobulina que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, GAMMAR™, IVEEGAM™, SANDOGLOBULIN™, GAMMAGARD S/D™, ATGAM™ (globulina antitímocítica), y GAMIMUNE™. En una realización específica, las
- 10 proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con preparaciones intravenosas de inmunoglobulina en terapia de trasplantes (p. ej., trasplante de médula ósea).

- En otra realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran solos o como parte de una terapia combinada, o bien in vivo a pacientes o bien in vitro a células, para el tratamiento del cáncer. En una realización específica, las proteínas de fusión de albúmina, concretamente las fusiones de IL-2-
- 15 albúmina, se administran repetidamente durante la inmunoterapia pasiva para el cáncer, tal como la terapia de transferencia de células adoptivas para el melanoma metastásico como describen Dudley et al. (Science Express, 19 Septiembre 2002., en www.scienceexpress.org, incorporada a la presente como referencia en su totalidad).

- En ciertas realizaciones, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran solos o combinados con un agente anti-inflamatorio. Los agentes anti-inflamatorios que se pueden administrar con las
- 20 proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides (p. ej., betametasona, budesonida, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, y triamcinolona), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (p. ej., diclofenaco, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, floctafenina, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozin, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tenoxicam, ácido tiaprofénico, y
- 25 tolmetina), así como antihistaminas, derivados de ácido aminoarilcarboxílico, derivados de ácido arilacético, derivados de ácido arilbutírico, ácidos arilcarboxílicos, derivados de ácido arilpropiónico, pirazoles, pirazonas, derivados de ácido salicílico, tiazinocarboxamidas, ácido e-acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxibutírico, amixetrina, bendazac, benzidamina, bucoloma, difenpiramida, ditazol, emorfazona, guaiazuleno, nabumetona, nimesulida, orgoteina, oxaceprol, paranilina, perisoxal, pifoxima, proquazona, proxazol, y tenidap.

- 30 En una realización adicional, las composiciones de la invención se administran solas o combinadas con un agente anti-angiogénico. Los agentes anti-angiogénicos que se pueden administrar con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, Angiostatina (Entremed, Rockville, MD), Troponina-1 (Boston Life Sciences, Boston, MA), Factor anti-Invasivo, ácido retinoico y derivados del mismo, paclitaxel (Taxol), Suramina, Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa-1, Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa-2, VEGI, Inhibidor de Activador de Plasminógeno-1, Inhibidor de Activador de Plasminógeno-2, y diversas formas de metales de transición del "grupo d" más ligeros.
- 35

Los metales de transición del "grupo d" más ligeros incluyen, por ejemplo, las especies de vanadio, molibdeno, tungsteno, titanio, niobio, y tántalo. Tales especies de metales de transición pueden formar complejos metálicos de transición. Los complejos adecuados de las especies de metales de transición mencionadas anteriormente incluyen oxocomplejos de metales de transición.

- 40 Los ejemplos representativos de los complejos de paladio incluyen oxocomplejos de vanadio tales como complejos de vanadato y vanadilo. Los complejos de vanadato adecuados incluyen complejos de metavanadato y ortovanadato tales como, por ejemplo, metavanadato de amonio, metavanadato de sodio, y ortovanadato de sodio. Los complejos de vanadilo adecuados incluyen, por ejemplo, acetilacetato de vanadilo y sulfato de vanadilo incluyendo hidratos de sulfato de vanadilo tales como monohidratos y trihidratos de sulfato de vanadilo.

- 45 Los ejemplos representativos de los complejos de tungsteno y molibdeno también incluyen oxocomplejos. Los oxocomplejos de tungsteno adecuados incluyen complejos de óxido de tungstato y tungsteno. Los complejos de tungstato adecuados incluyen tungstato de amonio, tungstato de calcio, tungstato de sodio dihidratado, y ácido túngstico. Los óxidos de tungsteno adecuados incluyen óxido de tungsteno (IV) y óxido de tungsteno (VI). Los oxocomplejos de molibdeno incluyen complejos de molibdato, óxido de molibdeno, y molibdenilo. Los complejos de molibdato adecuados incluyen molibdato de amonio y sus hidratos, y molibdato de potasio y sus hidratos. Los óxidos de molibdeno adecuados incluyen óxido de molibdeno (VI), óxido de molibdeno (VI), y ácido molíbdico. Los complejos de molibdenilo adecuados incluyen, por ejemplo, acetilacetato de molibdenilo. Otros complejos de tungsteno y molibdeno adecuados incluyen derivados hidroxilo obtenidos, por ejemplo, a partir de glicerol, ácido tartárico, y azúcares.
- 50

- 55 También se puede utilizar una amplia variedad de otros factores anti-angiogénicos dentro del contexto de la presente invención. Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a, factor de plaquetas 4; sulfato de protamina; derivados de quitina sulfatados (preparados a partir de conchas de cangrejo de las nieves), (Murata et al., Cancer Res. 51:22-26, (1991)); Complejo de Peptidoglicano Polisacárido Sulfatado (SP- PG) (la función de este compuesto se puede potenciar mediante la presencia de esteroides tales como estrógeno, y citrato de tamoxifeno);

- Staurosporina; moduladores del metabolismo de la matriz, incluyendo por ejemplo, análogos de prolina, cishidroxiprolina, d,L-3,4-deshidroprolina, Tiaprolina, alfa,alfa-dipiridilo, fumarato de aminopropionitrilo; 4-propil-5-(4-piridinil)-2(3H)oxazolona; Metotrexato; Mitoxantrona; Heparina; Interferones; 2 Macroglobulina-suero; ChIMP-3 (Pavloff et al., J. Bio. Chem. 267:17321-17326, (1992)); Quimostatina (Tomkinson et al., Biochem J. 286:475-480, (1992)); Tetradecasulfato de Ciclodextrina; Eponemicina; Camptotecina; Fumagilina (Ingber et al., Nature 348:555-557, (1990)); Tiomolato de Sodio y Oro ("GST"; Matsubara y Ziff, J. Clin. Invest. 79:1440-1446, (1987)); anticologenasa-suero; alfa2-antiplasmina (Holmes et al., J. Biol. Chem. 262(4):1659-1664, (1987)); Bisantreno (National Cancer Institute); Lobenzarit disódico (ácido N-(2)-carboxifenil-4-cloroantranílico disódico o "CCA"; (Takeuchi et al., Agents Actions 36:312-316, (1992)); e inhibidores de metaloproteinasas tales como BB94.
- 10 Otros factores anti-angiogénicos que también se pueden utilizar dentro del contexto de la presente invención incluyen Talidomida, (Celgene, Warren, NJ); esteroide angiostático; AGM-1470 (H. Brem y J. Folkman J Pediatr. Surg. 28:445-51 (1993)); un antagonista de integrina alfa v beta 3 (C. Storgard et al., J Clin. Invest. 103:47-54 (1999)); carboxinaminoimidazol; Carboxiamidotriazol (CAI) (National Cancer Institute, Bethesda, MD); Conbretastatina A-4 (CA4P) (OXIGENE, Boston, MA); Esqualamina (Magainin Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA); TNP-470. (Tap Pharmaceuticals, Deerfield, IL); ZD-0101 AstraZeneca (Londres, Reino Unido); APRA (CT2584); Benefina, Birstatina-1 (SC339555); CGP-41251 (PKC 412); CM101; Dexrazoxana (ICRF187); DMXAA; Endostatina; Flavopridiol; Genesteina; GTE; ImmTher; Iressa (ZD1839); Octreotide (Somatostatina); Panretina; Penacilamina; Photopoint; PI-88; Prinomastat (AG-3340) Purlitin; Suradista (FCE26644); Tamoxifeno (Nolvadex); Tazaroteno; Tetratiomolibdato; Xeloda (Capecitabina); y 5-Fluorouracilo.
- 15 Los agentes anti-angiogénicos que se pueden administrar combinados con los compuestos de la invención pueden funcionar a través una variedad de mecanismos que incluyen, pero no se limitan a, inhibición de la proteólisis de la matriz extracelular, bloqueo de la función de las moléculas de adherencia célula endotelial-matriz extracelular, suscitando antagonismo de la función de los inductores de la angiogénesis tales como factores de crecimiento, e inhibiendo los receptores de integrina expresados sobre células endoteliales en proliferación. Los ejemplos de
- 20 inhibidores anti-angiogénicos que interfieren en la proteólisis de la matriz extracelular y que se pueden administrar combinados con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, AG-3340 (Agouron, La Jolla, CA), BAY-12-9566 (Bayer, West Haven, CT), BMS-275291 (Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ), CGS-27032A (Novartis, East Hanover, NJ), Marimastat (British Biotech, Oxford, Reino Unido), y Metastat (Aetema, St-Foy, Quebec). Los ejemplos de inhibidores anti-angiogénicos que actúan bloqueando la función de las moléculas de adherencia de
- 25 célula endotelial-matriz extracelular y que se pueden administrar combinados con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, EMD-121974 (Merck KgaA Darmstadt, Alemania) y Vitaxin (Ixsys, La Jolla, CA/Medimmune, Gaithersburg, MD). Los ejemplos de los agentes anti-angiogénicos que actúan suscitando antagonismo directamente o inhibiendo los inductores de la angiogénesis y que se pueden administrar combinados con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, Angiozyme (Ribozyme, Boulder, CO), anticuerpo Anti-VEGF (Genentech, S. San Francisco, CA), PTK-787/ZK-225846 (Novartis, Basilea, Suiza), SU-101 (Sugen, S. San Francisco, CA), SU-5416 (Sugen/ Pharmacia Upjohn, Bridgewater, NJ), y SU-6668 (Sugen). Otros agentes anti-angiogénicos actúan inhibiendo indirectamente la angiogénesis. Los ejemplos de los inhibidores indirectos de la angiogénesis que se pueden administrar combinados con las composiciones de la invención
- 30 incluyen, pero no se limitan a, IM-862 (Cytran, Kirkland, WA), Interferon-alfa, IL-12 (Roche, Nutley, NJ), y Pentosano polisulfato (Georgetown University, Washington, DC).

En realizaciones concretas, el uso de las composiciones de la invención combinadas con agentes anti-angiogénicos se contempla para el tratamiento, prevención, y/o alivio de una enfermedad autoinmunitaria, tal como por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria descrita en la presente memoria.

- 45 En una realización concreta, el uso de composiciones de la invención combinadas con agentes anti-angiogénicos se contempla para el tratamiento, prevención, y/o alivio de la artritis. En una realización más concreta, el uso de composiciones de la invención combinadas con agentes anti-angiogénicos se contempla para el tratamiento, prevención, y/o alivio de la artritis reumatoide.

- 50 En otra realización, los polinucleótidos que codifican un polipéptido de la presente invención se administran combinados con una proteína angiogénica, o con polinucleótidos que codifican una proteína angiogénica. Los ejemplos de proteínas angiogénicas que se pueden administrar con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos, VEGF-1, VEGF-2, VEGF-3, factor de crecimiento epidérmico alfa y beta, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de tipo insulínico, factor estimulador de colonias, factor estimulador de colonias de macrófagos, factor
- 55 estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, y óxido nítrico sintasa.

- En realizaciones adicionales, las composiciones de la invención se administran combinadas con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a agentes alquilantes tales como mostazas nitrogenadas (por ejemplo, Mecloretamina, ciclofosfamida, Ciclofosfamida Ifosfamida, Melfalan (L-sarcolisina), y Clorambucilo), etileniminas y metilmelaminas (por ejemplo, Hexametilmelamina y Tiotepa), sulfonatos de alquilo (por ejemplo, Busulfan), nitrosoureas (por ejemplo, Carmustina (BCNU), Lomustina (CCNU), Semustina (metil-CCNU), y
- 60

Estreptozocina (estreptozotocina)), triazenos (por ejemplo, Dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazolcarboxamida)), análogos de ácido fólico (por ejemplo, Metotrexato (ametofterina)), análogos de pirimidina (por ejemplo, Fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), Floxuridina (fluorodesoxiuridina; FudR), y Citarabina (citiosinarabinósido)), análogos de purina e inhibidores relacionados (por ejemplo, Mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), Tioguanina (6-tioguanina; TG), y Pentostatina (2'-desoxicoformicina)), alcaloides de vinca (por ejemplo, Vinblastina (VLB, sulfato de vinblastina)) y Vincristina (sulfato de vincristina)), epipodofilotoxinas (por ejemplo, Etoposido y Teniposido), antibióticos (por ejemplo, Dactinomicina (actinomicina D), Daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), Doxorubicina, Bleomicina, Plicamicina (mitramicina), y Mitomicina (mitomicina C), enzimas (por ejemplo, L-Asparaginasa), modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, Interferon-alfa e interferon-alfa-2b), compuestos de coordinación de platino (por ejemplo, Cisplatino (cis-DDP) y Carboplatino), antracenodiona (Mitoxantrona), ureas sustituidas (por ejemplo, Hidroxiurea), derivados de metilhidrazina (por ejemplo, Procarbazina (N-metilhidrazina; MIH), adrenocorticoesteroides (por ejemplo, Prednisona), progestinas (por ejemplo, caproato de hidroxiprogesterona, Medroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, y acetato de megestrol), estrógenos (por ejemplo, Dietilestilbestrol (DES), Difosfato de dietilestilbestrol, Estradiol, y Etinil estradiol), antiestrógenos (por ejemplo, Tamoxifeno), andrógenos (Propionato de testosterona, y Fluoximesterona), antiandrógenos (por ejemplo, Flutamida), análogos de hormonas liberadora de gonadotropina (por ejemplo, Leuprolida), otras hormonas o análogos de hormonas (por ejemplo, metilttestosterona, estramustina, estramustina fosfato sódico, clorotrianiseno, y testolactona), y otros (por ejemplo, dicarbazina, ácido glutámico, y mitotano).

En una realización, las composiciones de la invención se administran combinadas con uno o más de los siguientes fármacos: infliximab (también conocido como Remicade™ Centocor, Inc.), Trocade (Roche, RO-32-3555), Leflunomida (también conocido como Arava™ de Hoechst Marion Roussel), Kineret™ (un antagonista del receptor de IL-1 también conocido como Anakinra de Amgen, Inc.)

En una realización específica, las composiciones de la invención se administran combinadas con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona) o combinaciones de dos o más de los componentes de CHOP. En una realización, las composiciones de la invención se administran combinadas con anticuerpos anti-CD20, anticuerpos monoclonales anti-CD20 humanos. En otra realización, las composiciones de la invención se administran combinadas con anticuerpos anti-CD20 y CHOP, o anticuerpos anti-CD20 y cualquier combinación de uno o más de los componentes de CHOP, concretamente ciclofosfamida y/o prednisona. En una realización específica, las composiciones de la invención se administran combinadas con Rituximab. En una realización adicional, las composiciones de la invención se administran con Rituximab y CHOP, o Rituximab y cualquier combinación de uno o más de los componentes de CHOP, concretamente ciclofosfamida y/o prednisona. En una realización específica, las composiciones de la invención se administran combinadas con tositumomab. En una realización adicional, las composiciones de la invención se administran con tositumomab y CHOP, o tositumomab y cualquier combinación de uno o más de los componentes de CHOP, concretamente ciclofosfamida y/o prednisona. Los anticuerpos anti-CD20 se pueden asociar opcionalmente con radioisótopos, toxinas o fármacos citotóxicos.

En otra realización específica, las composiciones de la invención se administran combinadas con Zevalin™. En una realización adicional, las composiciones de la invención se administran con Zevalin™ y CHOP, o Zevalin™ y cualquier combinación de uno o más de los componentes de CHOP, concretamente ciclofosfamida y/o prednisona. Zevalin™ puede estar asociado con uno o más radioisótopos. Los isótopos particularmente preferidos son ⁹⁰Y e ¹¹¹In.

En una realización adicional, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con citoquinas. Las citoquinas que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL15, anti-CD40, CD40L, IFN-gamma y TNF-alfa. En otra realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se pueden administrar con cualquier interleuquina, incluyendo, pero no limitada a, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, e IL-21.

En una realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con miembros de la familia de TNF. Las moléculas de TNF, relacionadas con TNF o de tipo TNF que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, formas solubles de TNF-alfa, linfotoxina-alfa (LT-alfa, también conocida como TNF-beta), LT-beta (encontrado en el heterotrímero complejo LT-alfa2-beta), OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF-gamma (Publicación Internacional Núm. WO 96/14328), AIM-1 (Publicación Internacional Núm. WO 97/33899), endoquina-alfa (Publicación Internacional Núm. WO 98/01880), OPG, y neutroquina-alfa (Publicación Internacional Núm. WO 98/18921, OX40, y factor de crecimiento nervioso (NGF), y formas solubles de Fas, CD30, CD27, CD40 y 4-1BB, TR2 (Publicación Internacional Núm. WO 96/34095), DR3 (Publicación Internacional Núm. WO 91/33904), DR4 (Publicación Internacional Núm. WO 98/32856), TR5 (Publicación Internacional Núm. WO 98/30693), TRANK, TR9 (Publicación Internacional Núm. WO 98/56892), TR10 (Publicación Internacional Núm. WO 98/54202), 312C2 (Publicación Internacional Núm. WO 98/06842), y TR12, formas solubles de CD154, CD70, y CD153.

En una realización adicional, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran

combinados con proteínas angiogénicas. Las proteínas angiogénicas que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, Factor de Crecimiento Derivado de Glioma (GDGF), como se describe en la Patente Europea Número EP-399816; Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas-A (PDGF-A), como se describe en la Patente Europea Número EP-682110; Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas-B (PDGF-B), como se describe en la Patente Europea Número EP-282317; Factor de Crecimiento Placentario (PIGF), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 92/06194; Factor de Crecimiento Placentario-2 (PIGF-2), como describen Hauser et al., Growth Factors, 4:259-268 (1993); Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 90/13649; Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-A (VEGF-A), como se describe en la Patente Europea Número EP-506477; Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-2 (VEGF-2), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 96/39515; Factor de Crecimiento Endotelial vascular B (VEGF-3); Factor de Crecimiento Endotelial Vascular B-186 (VEGF-B186), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 96/26736; Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-D (VEGF-D), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 98/02543; Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-D (VEGF-D), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 98/07832; y Factor de Crecimiento Endotelial vascular-E (VEGF-E), como se describe en la Patente Alemana Número DE19639601. Las referencias anteriormente mencionadas se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

En una realización adicional, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con Factores de Crecimiento de Fibroblastos. Los Factores de Crecimiento de Fibroblastos que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, y FGF-15.

En una realización adicional, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con factores de crecimiento hematopoyéticos. Los factores de crecimiento hematopoyéticos que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, factor estimulador de las colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) (sargramostim, LEUKINE™, PROKINE™), factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF) (filgrastim, NEUPOGEN™), factor estimulador de las colonias de macrófagos (M-CSF, CSF-1) eritropoyetina (epoetin alfa, EPOGEN™, PROCRT™), factor de células madre (SCF, ligando c-kit, factor de Steel), factor estimulador de las colonias de megacariocitos, PIXY321 (una proteína de fusión de GMCSF/IL-3), interleuquinas, especialmente uno o más cualesquiera de IL-1 a IL-12, interferón-gamma, o trombopoyetina.

En ciertas realizaciones, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la presente invención se administran combinados con bloqueadores adrenérgicos, tales como, por ejemplo, acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carteolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propranolol, sotalol, y timolol.

En otra realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con un fármaco anti-arrítmico (p. ej., adenosina, amiodarona, bretilio, digitalis, digoxina, digitoxina, diltiazem, disopiramida, esmolol, flecainida, lidocaina, mexiletina, moricizina, fenitoína, procainamida, N-acetil procainamida, propafenona, propranolol, quinidina, sotalol, tocainida, y verapamilo).

En otra realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con agentes diuréticos, tales como agentes inhibidores de anhidrasa carbónica (p. ej., acetazolamida, diclorfenamida, y metazolamida), diuréticos (p. ej., glicerina, isosorbida, manitol, y urea), diuréticos que inhiben el simporte de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (p. ej., furosemida, bumetanida, azosemida, piretanida, tripamida, ácido etacrínico, muzolimina, y torsemida), tiazida y diuréticos de tipo tiazida (p. ej., bendroflumetiazida, benzotiazida, clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, meticlotiazida, poltiazida, tricormetiazida, clortalidona, indapamida, metolazona, y quinetazona), diuréticos economizadores de potasio (p. ej., amilorida y triamtereno), y antagonistas de receptores de mineralocorticoides (p. ej., espironolactona, canrenona, y canrenoato de potasio).

En una realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con tratamientos para trastornos de desequilibrios endocrinos y/u hormonales. Los tratamientos para los trastornos endocrinos y/u hormonales incluyen, pero no se limitan a, ^{127}I , isótopos radiactivos de yodo tales como ^{131}I e ^{123}I ; hormona de crecimiento recombinante, tal como HUMATROPE™ (somatotropina recombinante); análogos de hormona de crecimiento tales como PROTROPIN™ (somatrem); agonistas de dopamina tales como PARLODEL™ (bromocriptina); análogos de somatostatina tales como SANDOSTATIN™ (octreotide); preparaciones de gonadotropina tales como PREGNYL™, A.P.L.™ and PROFASP™ (gonadotropina coriónica (CG)), PERGONAL™ (menotropinas), y METRODIN™ (urofolitropina (uFSH)); preparaciones de hormona liberadora de gonadotropina humana sintéticas tales como FACTREL™ y LUTREPULSE™ (hidrocloruro de gonadorelina); agonistas de gonadotropina sintéticos tales como LUPRON™ (acetato de leuprolida), SUPPRELIN™ (acetato de histrelina), SYNAREL™ (acetato de nafarelina), y ZOLADEX™ (acetato de goserelina); preparaciones sintéticas de hormona liberadora de tirotropina tales como RELEFACT TRH™ y THYPINONE™ (protirelina); TSH humana recombinante tal como THYROGEN™; preparaciones sintéticas de las sales de sodio de los isómeros naturales de hormonas tiroideas tales como L-T₄™, SYNTHROID™ y LEVOTHROID™ (levotiroxina sódica), L-T₃™, CYTOMEL™ y TRIOSTAT™ (liotironina sódica), y THYROLAR™ (liotrix); compuestos anti-tiroideos tales como 6-n-propiltiouracilo

(propiltiouracilo), 1-metil-2-mercaptoimidazol y TAPAZOLE™ (metimazol), NEO-MERCAZOLE™ (carbimazol); antagonistas de receptores beta-adrenergicos tales como propranolol y esmolol; bloqueadores del canal de Ca^{2+} ; dexametasona y agentes de contraste radiológico yodados tales como TELEPAQUE™ (ácido iopanoico) y ORAGRAFIN™ (ipodato sódico).

- 5 Los tratamientos adicionales para los trastornos de desequilibrio endocrino y/u hormonal incluyen, pero no se limitan a, estrógenos o estrógenos conjugados tales como ESTRACE™ (estradiol), ESTINYL™ (etinil estradiol), PREMARIN™, ESTRATAB™, ORTHO-EST™, OGEN™ y estropipato (estrona), ESTROVIS™ (quínestrol), ESTRADERM™ (estradiol), DELESTROGENT™ y VALERGEN™ (valerato de estradiol), DEPO-ESTRADIOL CYPIONATE™ y ESTROJECT LA™ (cipionato de estradiol); antiestrógenos tales como NOLVADEX™ (tamoxifeno), SEROPHENE™ y CLOMID™ (clomifeno); progestinas tales como DURALUTIN™ (caproato de hidroxiprogesterona), MPA™ y DEPO-PROVERA™ (acetato de medroxiprogesterona), PROVERA™ y CYCRIN™ (MPA), MEGACE™ (acetato de megesterol), NORLUTIN™ (noretindrona), y NORLUTATE™ y AYGESTIN™ (acetato de noretindrona); implantes de progesterona tales como NORPLANT SYSTEM™ (implantes subdérmicos de norgestrel); antiprogestinas tales como RU 486™ (mifepristona); contraceptivos hormonales tales como ENOVID™ (noretinodrel plus mestranol), PROGESTASERT™ (dispositivo intrauterino que libera progesterona), LOESTRIN™, BREVICON™, MODICON™, GENORA™, NELONA™, NORINYL™, OVA-CON-35™ and OVA-CON-50™ (etinil estradiol/noretindrona), LEVLEN™, NORDETTE™, TRI-LEVLEN™ y TRIPHASIL-21™ (etinil estradiol/levonorgestrel) LO/OVRAL™ y OVRAL™ (etinil estradiol/norgestrel), DEMULEN™ (etinil estradiol/diacetato de etinodiol), NORINYL™, ORTHO-NOVUM™, NORETHIN™, GENORA™, y NELOVA™ (noretindrona/mestranol), DESOGEN™ y ORTHO-CEPT™ (etinil estradiol/desogestrel), ORTHO-CYCLEN™ y ORTHO-TRICYCLEN™ (etinil estradiol/norgestimato), MICRONOR™ y NOR-QD™ (noretindrona), y OVRETTE™ (norgestrel).

- Otros tratamientos para los trastornos de desequilibrio endocrino y/u hormonal incluyen, pero no se limitan a, ésteres de testosterona tales como acetato de metenolona y undecanoato de testosterona; andrógenos parenterales y orales tales como TESTOJECT-50™ (testosterona), TESTEX™ (propionato de testosterona), DELATESTRYL™ (enantato de testosterona), DEPO-TESTOSTERONE™ (cipionato de testosterona), DANOCRINE™ (danazol), HALOTESTIN™ (fluoximesterona), ORETON METHYL™, TESTRED™ y VIRILON™ (metiltestosterona), y OXANDRIN™ (oxandrolona); sistemas transdérmicos de testosterona tales como TESTODERM™; antagonista de receptor de andrógeno e inhibidores de 5-alfa-reductasa tales como ANDROCUR™ (acetato de ciproterona), EULEXIN™ (flutamida), y PROSCAR™ (finasterida); preparaciones de hormona adrenocorticotrópica tales como CORTROSYN™ (cosintropina); esteroides adrenocorticales y sus análogos sintéticos tales como ACLOVATE™ (dipropionato de alclometasona), CYCLOCORT™ (amcinonida), BECLOVENT™ y VANCERIL™ (dipropionato de beclometasona), CELESTONE™ (betametasona), BENISONE™ y UTICORT™ (benzoato de betametasona), DIPROSONE™ (dipropionato de betametasona), CELESTONE PHOSPHATE™ (fosfato de betametasona sódica), CELESTONE SOLUSPAN™ (fosfato y acetato de betametasona sódica), BETA-VAL™ y VALISONE™ (valerato de betametasona), TEMOVATE™ (propionato de clobetasol), CLODERM™ (pivalato de clocortolona), CORTEF™ e HYDROCORTONE™ (cortisol (hidrocortisona)), HYDROCORTONE ACETATE™ (acetato de cortisol (hidrocortisona)), LOCOID™ (butirato de cortisol (hidrocortisona)), HYDROCORTONE PHOSPHATE™ (fosfato sódico de cortisol (hidrocortisona)), A-HYDROCORT™ y SOLU CORTEX™ (succinato sódico de cortisol (hidrocortisona)), WESTCORT™ (valerato de cortisol (hidrocortisona)), CORTISONE ACETATE™ (acetato de cortisona), DESOWEN™ y TRIDESILON™ (desonida), TOPICORT™ (desoximetasona), DECADRON™ (dexametasona), DECADRON LA™ (acetato de dexametasona), DECADRON PHOSPHATE™ y HEXADROL PHOSPHATE™ (fosfato sódico de dexametasona), FLORONE™ y MAXIFLOR™ (diacetato de diflorasona), FLORINEF ACETATE™ (acetato de fludrocortisona), AEROBID™ y NASALIDE™ (flunisolida), FLUONID™ y SYNALAR™ (fluocinolona acetónido), LIDEX™ (fluocinonida), FLUOR-OP™ y FML™ (fluorometolona), CORDRAN™ (flurandrenolida), HALOG™ (halcinonida), HMS LIZUIFILM™ (medrisona), MEDROL™ (metilprednisolona), DEPO-MEDROL™ y MEDROL ACETATE™ (acetato de metilprednisolona), A-METHAPRED™ y SOLUMEDROL™ (succinato sódico de metilprednisolona), ELOCON™ (furoato de mometasona), HALDRONE™ (acetato de parametasona), DELTA-CORTEF™ (prednisolona), ECONOPRED™ (acetato de prednisolona), HYDELTRASOL™ (fosfato sódico de prednisolona), HYDELTRA-T.B.A™ (tebutato de prednisolona), DELTASONE™ (prednisona), ARISTOCORT™ y KENACORT™ (triamcinolona), KENALOG™ (acetónido de triamcinolona), ARISTOCORT™ y KENACORT DIACETATE™ (diacetato de triamcinolona), y ARISTOSPAN™ (hexacetónido de triamcinolona); inhibidores de la biosíntesis y la acción de esteroides adrenocorticales tales como CYTADREN™ (aminoglutetimida), NIZORAL™ (ketoconazol), MODRASTANE™ (trilostano), y METOPIRONE™ (metirapona); insulina bovina, porcina o humana o mezclas de las mismas; análogos de insulina; insulina humana recombinante tal como HUMULIN™ y NOVOLIN™; agentes hipoglucémicos orales tales como ORAMIDE™ y ORINASE™ (tolbutamida), DIABINESE™ (clorpropamida), TOLAMIDE™ y TOLINASE™ (tolazamida), DYMELOR™ (acetohexamida), glibenciamida, MICRONASE™, DIBETA™ y GLYNASE™ (gliburida), GLUCOTROL™ (glipizida), y DIAMICRON™ (gliclazida), GLUCOPHAGE™ (metformina), ciglitazona, pioglitazona, e inhibidores de alfa-glucosidasa; glucagón bovino o porcino; somatostatinas tales como SANDOSTATIN™ (octreotide); y diazóxidos tales como PROGLYCEM™ (diazóxido).

En una realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con tratamientos para trastornos de la motilidad uterina. Los tratamientos para trastornos de la motilidad uterina incluyen, pero no se limitan a, fármacos de estrógenos tales como estrógenos conjugados (p. ej.,

PREMARIN® y ESTRATAB®, estradiolos (p. ej., CLIMARA® y ALORA®), estropipato, y clorotrianiseno; fármacos de progestina (p. ej., AMEN® (medroxiprogesterona), MICRONOR® (acetato de noretidrona), PROMETHIUM® progesterona, y acetato de megestrol); y terapias combinadas de estrógeno/progesterona tales como, por ejemplo, estrógenos/medroxiprogesterona conjugados (p. ej., PREMPRO™ y PREMPHASE®) y acetato de noretindrona/etinil estradiol (p. ej., FEMHRT™).

En una realización adicional, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con fármacos eficaces en el tratamiento de la deficiencia de hierro y las anemias hipocrómicas, incluyendo pero no limitados a, sulfato ferroso (sulfato de hierro, FEOSOL™), fumarato ferroso (p. ej., FEOSTAT™), gluconato ferroso (p. ej., FERGON™), complejo de polisacárido-hierro (p. ej., NIFEREX™), inyección de hierro dextrano (p. ej., INFED™), sulfato cúprico, piroxidina, riboflavina, Vitamina B₁₂, inyección de ciancobalamina (p. ej., REDISOL™, RUBRAMIN PC™), hidroxocobalamina, ácido fólico (p. ej., FOLVITE™), leucovorina (ácido folínico, 5-CHOH4PteGlu, factor citrovorum) o WELLCOVORIN (Sal de calcio de leucovorina), transferrina o ferritina.

En ciertas realizaciones, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con agentes utilizados para tratar trastornos psiquiátricos. Los fármacos psiquiátricos que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, agentes antipsicóticos (p. ej., clorpromazina, clorprotixeno, clozapina, flufenazina, haloperidol, loxapina, mesoridazina, molindona, olanzapina, perfenazina, pimozida, quetiapina, risperidona, tioridazina, tiotixeno, trifluoperazina, y triflupromazina), agentes antimaníacos (p. ej., carbamazepina, divalproex sódico, carbonato de litio, y citrato de litio), antidepresivos (p. ej., amitriptilina, amoxapina, bupropion, citalopram, clomipramina, desipramina, doxepin, fluvoxamina, fluoxetina, imipramina, isocarboxazida, maprotilina, mirtazapina, nefazodona, nortriptilina, paroxetina, fenelzina, protriptilina, sertralina, tranilcipromina, trazodona, trimipramina, y venlafaxina), agentes anti-ansiedad (p. ej., alprazolam, buspirona, clordiazepóxido, clorazepato, diazepam, halazepam, lorazepam, oxazepam, y prazepam), y estimulantes (p. ej., d-anfetamina, metilfenidato, y pemolina).

En otras realizaciones, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con agentes utilizados para tratar trastornos neurológicos. Los agentes neurológicos que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, agentes antiepilépticos (p. ej., carbamazepina, clonazepam, etosuximida, fenobarbital, fenitoína, primidona, ácido valproico, divalproex sódico, felbamato, gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, tiagabina, topiramato, zonisamida, diazepam, lorazepam, y clonazepam), agentes anti-parkinsonianos (p. ej., levodopa/carbidopa, selegilina, amantidina, bromocriptina, pergolida, ropinirol, pramipexol, benzotropina; biperideno; etopropazina; prociclidina; trihexifenidilo, tolcapona), y agentes terapéuticos para ELA (p. ej., riluzol).

En otra realización, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con agentes vasodilatadores y/o agentes bloqueadores del canal del calcio. Los agentes vasodilatadores que se pueden administrar con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la Enzima Conversora de Angiotensina (ACE) (p. ej., papaverina, isoxsuprina, benazepril, captopril, cilazapril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, moexipril, perindopril, quinapril, ramipril, espirapril, trandolapril, y nilidrina), y nitratos (p. ej., dinitrato de isosorbida, mononitrato de isosorbida, y nitroglicerina). Los ejemplos de los agentes bloqueadores del canal de calcio que se pueden administrar combinados con las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a amlodipina, bepridil, diltiazem, felodipina, flunarizina, isradipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, y verapamilo.

En ciertas realizaciones, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con tratamientos para trastornos gastrointestinales. Los tratamientos para los trastornos gastrointestinales que se pueden administrar con la proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, antagonistas del receptor de histamina H₂ (p. ej., TAGAMET™ (cimetidina), ZANTAC™ (ranitidina), PEPCID™ (famotidina), y AXID™ (nizatidina)); inhibidores de ATPasa H⁺, K⁺ (p. ej., PREVACID™ (lansoprazol) y PRILOSEC™ (omeprazol)); compuestos de Bismuto (p. ej., PEPTO-BISMOL™ (subsalicilato de bismuto) y DE-NOL™ (subcitrato de bismuto)); diversos antiácidos; sucralfato; análogos de prostaglandinas (p. ej., CYTOTEK™ (misoprostol)); antagonistas colinérgicos muscarínicos; laxantes (p. ej., laxantes tensioactivos, laxantes estimulantes, laxantes salinos y osmóticos); agentes anti-diarreicos (p. ej., LOMOTIL™ (difenoxilato), MOTOFEN™ (difenoxina), y IMODIUM™ (hidrocloruro de loperamida)), análogos sintéticos de somatostatina tales como SANDOSTATIN™ (octreotide), agentes antieméticos (p. ej., ZOFRAN™ (ondansetron), KYTRIL™ (hidrocloruro de granisetron), tropisetron, dolasetron, metoclopramida, clorpromazina, perfenazina, proclorperazina, prometazina, tietilperazina, triflupromazina, domperidona, haloperidol, droperidol, trimetobenzamida, dexametasona, metilprednisolona, dronabinol, y nabilona); antagonistas D₂ (p. ej., metoclopramida, trimetobenzamida y clorpromazina); sales biliares; ácido quenodesoxicólico; ácido ursodesoxicólico; y preparaciones de enzimas pancreáticas tales como pancreatina y pancrelipasa.

En realizaciones adicionales, las proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran combinados con otros regímenes terapéuticos o profilácticos, tales como, por ejemplo, terapia de radiación.

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados

con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de fusión de albúmina de la invención. Opcionalmente asociada con tales recipientes puede haber una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de fármacos o productos biológicos, cuya notificación refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración a seres humanos.

Terapia Génica

Los constructos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar como parte de un protocolo de terapia génica para liberar dosis terapéuticamente eficaces de la proteína de fusión de albúmina. Un enfoque preferido para la introducción *in vivo* de ácido nucleico en una célula es mediante el uso de un vector viral que contiene ácido nucleico, que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de las células elegidas como diana puede recibir el ácido nucleico. Adicionalmente, las moléculas codificadas dentro del vector viral, p. ej., por un ADNc contenido en el vector viral, se expresan eficazmente en células que han absorbido ácido nucleico viral.

Los vectores de retrovirus y los vectores de virus adeno-asociados se pueden utilizar como un sistema de liberación génica recombinante para la transferencia de moléculas de ácido nucleico exógenas que codifican proteínas de fusión de albúmina *in vivo*. Estos vectores proporcionan un suministro eficaz de ácidos nucleicos a las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran establemente en el ADN cromosómico del anfitrión. El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas "células de empaquetamiento") que producen solamente retrovirus de replicación defectuosa ha incrementado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica, y los retrovirus defectuosos se caracterizan para su uso en la transferencia de genes para la terapia génica (para una revisión véase Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:27 1). Un retrovirus de replicación defectuosa se puede empaquetar en viriones que se pueden utilizar para infectar una célula diana por medio del uso de un virus coadyuvante mediante técnicas convencionales. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con tales virus se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F.M. et al., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio convencionales.

Otro sistema de suministro de genes virales útil en la presente invención utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de adenovirus se puede manipular de manera que éste codifique y exprese un producto génico de interés pero esté inactivado en términos de su capacidad para replicar en un ciclo de vida viral lítico normal. Véanse, por ejemplo, Berkner et al., *BioTechniques* 6:616 (1988); Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); y Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992). Los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (p. ej., Ad2, Ad3, Ad7 etc.) son conocidos por los expertos la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden resultar ventajosos en algunas circunstancias ya que no son capaces de infectar células que no están en división y se pueden utilizar para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluyendo células epiteliales (Rosenfeld et al., (1992) citado más arriba). Además, la partícula de virus es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y como antes, se puede modificar con el fin de influir en el espectro de infectividad. Adicionalmente, el ADN adenoviral introducido (y el ADN foráneo contenido en él) no es integrado en el genoma de una célula anfitriona sino que sigue siendo episómico, evitando de ese modo potenciales problemas que se pueden producir como resultado de la mutagénesis insercional en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma del anfitrión (p. ej., ADN retroviral). Por otra parte, la capacidad portadora del genoma adenoviral para el ADN foráneo es grande (hasta 8 kilobases) con respecto a otros vectores de suministro de genes (Berkner et al., citado más arriba; Haj-Ahmand et al., *J. Virol.* 57:267 (1986)).

En otra realización, los sistemas de suministro de genes no virales de la presente invención se basan en rutas endocíticas para la absorción de la molécula de nucleótido sujeto por la célula elegida como diana. Los sistemas de suministro de genes ilustrativos de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, productos conjugados de poli-lisina, y envolturas virales artificiales. En una realización representativa, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención puede ser atrapada en liposomas que portan cargas positivas sobre su superficie (p. ej., lipofectinas) y (opcionalmente) que están etiquetadas con anticuerpos contra antígenos de la superficie celular del tejido diana (Mizuno et al. (1992) *No Shinkei Geka* 20:547-5 5 1; Publicación PCT WO91/06309; Solicitud de Patente Japonesa 1047381; y Publicación de patente Europea EP-A-43075).

Los sistemas de suministro de genes para un gen que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden introducir en un paciente mediante cualquiera de numerosos métodos. Por ejemplo, se puede introducir una preparación farmacéutica del sistema de suministro de genes sistémicamente, p. ej., mediante inyección intravenosa, y la transducción específica de la proteína en las células diana se produce predominantemente a partir de la especificidad de la transfección proporcionada por el vehículo de suministro de genes, la expresión del tipo de célula o tipo de tejido debida a las secuencias reguladoras de la transcripción que controlan la expresión del receptor del gen, o una combinación de las mismas. En otras realizaciones, el suministro inicial del gen recombinante está más limitado con una introducción en el animal que está bastante localizada. Por ejemplo, el vehículo de suministro génico se puede introducir por medio de un catéter (véase la Patente de los Estados Unidos 5.328.470) o por medio de inyección Estereotáctica (p. ej., Chen et al. (1994) *PNAS* 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del constructo de terapia génica puede consistir esencialmente en el sistema de suministro génico en un diluyente farmacéuticamente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está incluido el vehículo

de suministro génico. Cuando la proteína de fusión de albúmina puede ser producida intacta a partir de células recombinantes, p. ej., vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede comprender una o más células que producen la proteína de fusión de albúmina.

Métodos adicionales de terapia génica

- 5 También están incluidos en la invención los métodos de terapia génica para el tratamiento o la prevención de trastornos, enfermedades y afecciones. Los métodos de terapia génica hacen referencia a la introducción de secuencias de ácido nucleico desnudo (ADN, ARN, y ADN o ARN antisentido) en un animal para lograr la expresión de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Este método requiere un polinucleótido que codifique una proteína de fusión de albúmina de la presente invención conectado operativamente a un promotor y cualquier otro elemento genético necesario para la expresión de la proteína de fusión por el tejido diana. Tales mecanismos de terapia y suministro génicos se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, el documento WO90/11092, que se incorpora a la presente memoria como referencia.

- De este modo, por ejemplo, se pueden modificar las células de un paciente con un polinucleótido (ADN o ARN) que comprende un promotor conectado operablemente a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención ex vivo, proporcionándose a continuación las células modificadas a un paciente que va a ser tratado con la proteína de fusión de la presente invención. Tales métodos de PCR son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, véanse Beldegrun, A., et al., J. Natl. Cancer Inst. 85: 207-216 (1993); Ferrantini, M. et al., Cancer Research 53: 1107-1112 (1993); Ferrantini, M. et al., J. Immunology 153: 4604-4615 (1994); Kaido, T., et al., Int. J. Cancer 60: 221-229 (1995); Ogura, H. et al., Cancer Research 50: 5102-5106 (1990); Santodonato, L., et al., Human Gene Therapy 7:1-10 (1996); Santodonato, L., et al., Gene Therapy 4:1246-1255 (1997); y Zhang, J.-F. et al., Cancer Gene Therapy 3: 31-38 (1996)) que se incorporan a la presente memoria como referencia. En una realización, las células que se modifican son células arteriales. Las células arteriales se pueden reintroducir en el paciente a través de la inyección directa en la arteria, los tejidos que circundan la arteria, o a través de inyección mediante catéter.

- 25 Como se comenta con más detalle a continuación, los constructos de polinucleótido se pueden suministrar mediante cualquier método que suministre materiales inyectables a las células de un animal, tal como, inyección en el espacio o los tejidos intersticiales (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado, y similares). Los constructos de polinucleótido se pueden suministrar en un portador líquido o acuoso farmacéuticamente aceptable.

- En una realización, los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se suministran como polinucleótidos desnudos. El término polinucleótido, ADN o ARN "desnudo", hace referencia a secuencias que están libres de cualquier vehículo de suministro que actúa ayudando, promoviendo, o facilitando la entrada en la célula, incluyendo secuencias virales, partículas virales, formulaciones en liposomas, lipofectina o agentes de precipitación y similares. No obstante, los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención también se pueden suministrar en formulaciones con liposomas y formulaciones con lipofectina y similares que se pueden preparar mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.593.972, 5.589.466, y 5.580.859, que se incorporan a la presente memoria como referencia.

- Los constructos vectores de polinucleótidos utilizados en el método de terapia génica son preferiblemente constructos que no se integrarán en el genoma del anfitrión ni contendrán secuencias que permitan la replicación. Los vectores apropiados incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles en Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. y pEF1/V5, pcDNA3.1, y pRc/CMV2 disponible en Invitrogen. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en técnica.

- Se puede utilizar cualquier promotor fuerte conocido por los expertos en la técnica para dirigir la expresión de la secuencia de polinucleótido. Los promotores adecuados incluyen promotores adenovirales, tales como el promotor tardío principal adenoviral; o promotores heterólogos, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor del virus respiratorio sincitial (RSV); los promotores inducibles, tales como el promotor de MMT, el promotor de la metalotioneína; los promotores de choque térmico; el promotor de la albúmina; el promotor de ApoA1; los promotores de la globina humana; los promotores de la timidina quinasa viral, tales como el promotor de la timidina quinasa de Herpes Simplex; las LTR retrovirales; el promotor de la β -actina; y los promotores de la hormona del crecimiento humana. El promotor también puede ser el promotor nativo para el gen correspondiente a la porción de la proteína Terapéutica de las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

- A diferencia de otras técnicas de terapia génica, una ventaja principal de la introducción de secuencias de ácido nucleico desnudas en células diana es la naturaleza transitoria de la síntesis de polinucleótidos en las células. Estudios han demostrado que se pueden introducir secuencias de ADN no replicantes en las células para proporcionar la producción del polipéptido deseado durante períodos de hasta seis meses.

El constructo de polinucleótido se puede suministrar al espacio o los tejidos intersticiales dentro de un animal, incluyendo músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículo, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándula, y

tejido conectivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende la matriz de mucopolisacáridos fluida, intercelular, entre las fibras reticulares de los tejidos de los órganos, las fibras elásticas de las paredes de los vasos o cámaras, las fibras de colágeno de tejidos fibrosos, o esa misma matriz dentro del tejido conectivo que envuelve las células musculares o en las lagunas del hueso. Es, de un modo similar, el espacio ocupado por el plasma de la circulación y el fluido linfático de los canales linfáticos. Se prefiere el suministro al espacio intersticial del tejido muscular por las razones comentadas más abajo. Se pueden suministrar convenientemente mediante inyección en los tejidos que comprenden estas células. Se suministran y se expresan preferiblemente en células que no están en división persistentes que están diferenciadas, aunque el suministro y la expresión se pueden lograr en células no diferenciadas o diferenciadas menos completamente, tales como, por ejemplo, células madre de la sangre o fibroblastos de la piel. Las células musculares *in vivo* son particularmente competentes en su capacidad para absorber y expresar polinucleótidos.

Para la inyección de polinucleótido desnudo, una cantidad de dosificación eficaz de ADN o ARN oscilará en el intervalo de aproximadamente 0,05 g/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Preferiblemente la dosificación será de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg y más preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. Por supuesto, como apreciará el experto normal, esta dosificación variará de acuerdo con el sitio tisular de la inyección. La dosificación apropiada y eficaz de la secuencia de ácido nucleico puede ser determinada fácilmente por los expertos normales en la técnica y puede depender de la afección que se esté tratando y de la ruta de administración.

La ruta de administración preferida es mediante la ruta parenteral de inyección en el espacio intersticial de los tejidos. Sin embargo, también se pueden utilizar otras rutas parenterales, tales como, la inhalación de una formulación en aerosol concretamente para el suministro a los pulmones o a los tejidos bronquiales, la garganta o las membranas mucosas de la nariz. Adicionalmente, los constructos de ADN desnudo se pueden suministrar a las arterias durante la angioplastia por medio de un catéter utilizado en el procedimiento.

Los polinucleótidos desnudos se suministran mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, inyección con aguja directa en el sitio de suministro, inyección intravenosa, administración tópica, infusión con catéter, y las denominadas "pistolas génicas". Estos métodos de suministro son bien conocidos en la técnica.

Los constructos también pueden ser suministrados con vehículos de suministro tales como secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina, agentes de precipitación, etc. Tales métodos de suministro son conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, los constructos de polinucleótido forman complejos en una preparación de liposoma. Las preparaciones liposomales para su uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. No obstante, los liposomas catiónicos son particularmente preferidos debido a que se puede formar un complejo de carga densa entre el liposoma catiónico y el ácido nucleico polianiónico. Se ha demostrado que los liposomas catiónicos median el suministro intracelular del ADN plasmídico (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416, que se incorpora a la presente memoria como referencia); ARNm (Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:6077-6081, que se incorpora a la presente memoria como referencia); y factores de transcripción purificados (Debs et al., J. Biol. Chem. (1990) 265:10189-10192, que se incorpora a la presente memoria como referencia), en forma funcional.

Los liposomas catiónicos son fácilmente asequibles. Por ejemplo, los liposomas de N[1-2,3-dioleiloxy]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) son particularmente útiles y se encuentran disponibles bajo la marca de fábrica Lipofectin, de GIBCO BRL, Grand Island, N.Y. (Véase, también, Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416, que se incorpora a la presente memoria como referencia). Otros liposomas disponibles en el mercado incluyen transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer).

Se pueden preparar otros liposomas catiónicos a partir de materiales fácilmente asequibles utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., la Publicación PCT Núm. WO 90/11092 (que se incorpora a la presente memoria como referencia) para una descripción de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano). La preparación de liposomas de DOTMA se explica en la bibliografía, véase, p. ej., P. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, que se incorpora a la presente memoria como referencia. Se pueden utilizar métodos similares para preparar liposomas a partir de otros materiales lipídicos catiónicos.

De un modo similar, los liposomas aniónicos y neutros son fácilmente asequibles, por ejemplo de Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.), o se pueden preparar fácilmente utilizando materiales asequibles. Tales materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también se pueden mezclar con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en las proporciones apropiadas. Los métodos para elaborar liposomas utilizando estos materiales son bien conocidos en la técnica.

Por ejemplo, se pueden utilizar dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) comercialmente en diversas combinaciones para elaborar liposomas convencionales, con o sin la adición de colesterol. De este modo, por ejemplo, se pueden preparar vesículas de

DOPG/DOPC secando 50 mg de cada uno de DOPG y DOPC bajo una corriente de gas nitrógeno en un vial de sonicación. La muestra se coloca bajo una bomba de vacío durante la noche y se hidrata al día siguiente con agua desionizada. La muestra se somete a sonicación con posterioridad durante 2 horas en un vial tapado, utilizando un sonicator Heat Systems modelo 350 equipado con una sonda de copa invertida (tipo baño) al máximo ajuste mientras el baño se hace circular a 15 grados celsius. Alternativamente, se pueden preparar vesículas cargadas negativamente sin sonicación para producir vesículas multilamelares mediante extrusión a través de membranas con nucleoporos para producir vesículas unilamelares de tamaño discreto. Otros métodos son conocidos y se encuentran disponibles para los expertos en la técnica.

Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV), o vesículas unilamelares grandes (LUV), prefiriéndose las SUV. Los diversos complejos de liposoma-ácido nucleico se preparan utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Straubinger et al., *Methods of Immunology* (1983), 101:512-527, que se incorpora a la presente memoria como referencia. Por ejemplo, las MLV que contienen ácido nucleico se pueden preparar depositando una película fina de fosfolípido sobre las paredes de un tubo de vidrio e hidratando con posterioridad con una solución del material que se va a encapsular. Las SUV se preparan mediante sonicación ampliada de las MLV para producir una población homogénea de liposomas unilamelares. El material que va a ser atrapado se añade a una suspensión de MLV preformadas y a continuación se somete a sonicación. Cuando se utilizan liposomas que contienen lípidos catiónicos, la película de lípido seca se vuelve a suspender en una solución apropiada tal como agua estéril o solución de tampón isotónico tal como Tris/NaCl 10 mM, se somete a sonicación, y a continuación los liposomas preformados se mezclan directamente con el ADN. El liposoma y el ADN forman un complejo muy estable debido a la unión de los liposomas cargados positivamente al ADN catiónico. Las SUV encuentran uso con pequeños fragmentos de ácido nucleico. Las LUV se preparan mediante numerosos métodos, bien conocidos en la técnica. Los métodos comúnmente utilizados incluyen quelación con Ca^{2+} -EDTA (Papahadjopoulos et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1975) 394:483; Wilson et al., *Cell* 17:77 (1979)); inyección de éter (Deamer, D. y Bangham, A., *Biochim. Biophys. Acta* 443:629 (1976); Ostro et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76:836 (1977); Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3348 (1979)); diálisis con detergente (Enoch, H. y Strittmatter, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:145 (1979)); y evaporación en fase inversa (REV) (Fraley et al., *J. Biol. Chem.* 255:10431 (1980); Szoka, F. y Papahadjopoulos, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:145 (1978); Schaefer-Ridder et al., *Science* 215:166 (1982)), que se incorporan a la presente memoria como referencia.

Generalmente, la razón de ADN con respecto a liposomas será de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10. Preferiblemente, la razón será de aproximadamente 5:1 to aproximadamente 1:5. Más preferiblemente, la razón será de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:3. Aún más preferiblemente, la razón será de aproximadamente 1:1.

La Patente de los Estados Unidos Núm. 5.676.954 (que se incorpora a la presente memoria como referencia) se refiere la inyección de material genético, formando complejo con portadores de liposomas catiónicos, en ratones. Las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.897.355, 4.946.787, 5.049.386, 5.459.127, 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055, y la Publicación Internacional Núm. WO 94/9469 (que se incorporan a la presente memoria como referencia) proporcionan lípidos catiónicos para su uso en la transfección de ADN a células y mamíferos. Las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055, y la Publicación Internacional Núm. WO 94/9469 proporcionan métodos para el suministro de complejos de ADN-lípido catiónico a mamíferos.

En ciertas realizaciones, las células se modifican, *ex vivo* o *in vivo*, utilizando una partícula retroviral que contiene ARN que comprende una secuencia que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención. Los retrovirus a partir de los cuales se pueden obtener los vectores plasmídicos retrovirales incluyen, pero no se limitan a, Virus de la Leucemia Murina de Moloney, virus de necrosis del bazo, Virus del Sarcoma de Rous, Virus del Sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, virus de la leucemia del gibbon, virus de la inmunodeficiencia humana, Virus del Sarcoma Mieloproliferativo, y virus de tumor mamario.

El vector plasmídico retroviral se emplea para transducir líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas celulares productoras. Los ejemplos de las líneas celulares de empaquetamiento que se pueden transfectar incluyen, pero no se limitan a, las líneas celulares PE501, PA317, R-2, R-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, RCRE, RCRIP, GP+E-86, GP+envAm12, y DAN descritas por Miller, *Human Gene Therapy* 1:5-14 (1990), que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. El vector puede transducir las células de empaquetamiento mediante cualquier método conocido en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, la electroporación, el uso de liposomas, y la precipitación con CaPO_4 . En una alternativa, el vector plasmídico retroviral se puede encapsular en un liposoma, o acoplar a un lípido, y a continuación se puede administrar a un anfitrión.

La línea celular productora genera partículas de vector retroviral infeccioso que incluyen polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención. Tales partículas de vector retroviral se pueden emplear a continuación para transducir células eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las células eucarióticas transducidas expresarán una proteína de fusión de la presente invención.

En otras ciertas realizaciones, las células se modifican, *ex vivo* o *in vivo*, con polinucleótido contenido en un vector de adenovirus. El adenovirus se puede manipular de manera que éste codifique y exprese una proteína de fusión de la presente invención, y al mismo tiempo esté inactivado en términos de su capacidad para replicar en un ciclo de

vida viral lítico normal. La expresión del adenovirus se logra sin la integración del ADN viral en el cromosoma de la célula anfitriona, aliviando de ese modo los problemas de mutagénesis insercional. Además, se han utilizado adenovirus como vacunas entéricas vivas durante muchos años con un excelente perfil de seguridad (Schwartz et al. Am. Rev. Respir. Dis. 109:233-238 (1974)). Finalmente, se ha demostrado en numerosos casos la transferencia génica mediada por adenovirus, incluyendo la transferencia de alfa-1-antitripsina y CFTR a los pulmones de ratas algodóneras (Rosenfeld, M. A. et al. (1991) Science 252:431-434; Rosenfeld et al., (1992) Cell 68:143-155). Además, los estudios exhaustivos para intentar establecer los adenovirus como agentes causantes en el cáncer humano fueron uniformemente negativos (Green, M. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:6606).

Los vectores adenovirales adecuados útiles en la presente invención son descritos, por ejemplo, por Kozarsky y Wilson, Curr. Opin. Genet. Devel. 3:499-503 (1993); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Engelhardt et al., Human Genet. Ther. 4:759-769 (1993); Yang et al., Nature Genet. 7:362-369 (1994); Wilson et al., Nature 365:691-692 (1993); y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.652.224, que se incorporan a la presente memoria como referencia. Por ejemplo, el vector de adenovirus Ad2 es útil y se puede hacer crecer en células 293 humanas. Estas células contienen la región E1 de adenovirus y expresan constitutivamente E1a y E1b, que complementan los adenovirus defectuosos proporcionando los productos de los genes suprimidos del vector. Además de Ad2, otras variedades de adenovirus (p. ej., Ad3, Ad5, y Ad7) también son útiles en la presente invención.

Preferiblemente, los adenovirus utilizados en la presente invención son de replicación deficiente. Los adenovirus de replicación deficiente requieren la ayuda de un virus coadyuvante y/o una línea celular de empaquetamiento para formar partículas infecciosas. El virus resultante es capaz de infectar células y puede expresar un polinucleótido de interés que está conectado operablemente a un promotor, pero no puede replicar en la mayor parte de las células. Los adenovirus de replicación deficiente se pueden suprimir en uno o más de todos o una porción de los siguientes genes: E1a, E1b, E3, E4, E2a, o L1 a L5.

En otras ciertas realizaciones, las células se modifican, *ex vivo* o *in vivo*, utilizando un virus adeno-asociado (AAV). Los AAV son virus defectuosos de origen natural que requieren virus coadyuvantes para producir partículas infecciosas (Muzyczka, N., Curr. Topics in Microbiol. Immunol. 158:97 (1992)). También son uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no están en división. Los vectores que contienen tan pocos como 300 pares de bases de AAV se pueden empaquetar y se pueden integrar, pero el espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Los métodos para producir y utilizar tales AAV son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.139.941, 5.173.414, 5.354.678, 5.436.146, 5.474.935, 5.478.745, y 5.589.377.

Por ejemplo, un vector de AAV apropiado para su uso en la presente invención incluirá todas las secuencias necesarias para la replicación, encapsidación, e integración en la célula anfitriona del ADN. El constructo polinucleotídico se inserta en el vector de AAV utilizando métodos de clonación convencionales, tales como los encontrados en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989). El vector de AAV recombinante es transfectado a continuación en células de empaquetamiento que se infectan con un virus coadyuvante, utilizando cualquier mecanismo convencional, incluyendo lipofección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, etc. Los virus coadyuvantes apropiados incluyen adenovirus, citomegalovirus, virus vaccinia, o virus herpes. Una vez que las células de empaquetamiento son transfectadas e infectadas, producirán partículas virales de AAV infecciosas que contendrán el constructo polinucleotídico. Estas partículas virales se utilizan a continuación para transducir células eucarióticas, ya sea *ex vivo* o *in vivo*. Las células transducidas contendrán el constructo polinucleotídico integrado en su genoma, y expresarán una proteína de fusión de la invención.

Otro método de terapia génica implica asociar operablemente regiones de control heterólogas y secuencias de polinucleótidos endógenas (p. ej., que codifican un polipéptido de la presente invención) por medio de recombinación homóloga (véanse, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.641.670, presentada el 4 de Junio, 1997; la Publicación Internacional Núm. WO 96/29411, publicada el 26 de Septiembre, 1996; la Publicación Internacional Núm. WO 94/12650, publicada el 4 de Agosto, 1994; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); y Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989), que se incorporan a la presente memoria como referencia. Este método implica la activación de un gen que está presente en las células diana, pero que no es expresado normalmente en las células, o es expresado a un nivel inferior al deseado.

Los constructos polinucleotídicos se elaboran, utilizando mecanismos convencionales conocidos en la técnica, que contienen el promotor con secuencias de direccionamiento que flanquean el promotor. Los promotores adecuados se describen en la presente memoria. La secuencia de direccionamiento es suficientemente complementaria a una secuencia endógena para permitir la recombinación homóloga del promotor-secuencia de direccionamiento con la secuencia endógena. La secuencia de direccionamiento estará suficientemente cerca del extremo 5' de la secuencia polinucleotídica endógena deseada de manera que el promotor estará conectado operablemente a la secuencia endógena tras la recombinación homóloga.

El promotor y las secuencias de direccionamiento se pueden amplificar utilizando la PCR. Preferiblemente, el promotor amplificado contiene distintos sitios para enzimas de restricción en los extremos 5' y 3'. Preferiblemente, el extremo 3' de la primera secuencia de direccionamiento contiene el mismo sitio para enzima de restricción que el

extremo 5' del promotor amplificado y el extremo 5' de la segunda secuencia de direccionamiento contiene el mismo sitio para la enzima de restricción que el extremo 3' del promotor amplificado. El promotor amplificado y las secuencias de direccionamiento se digieren y se ligan entre sí.

5 El constructo de promotor-secuencia de direccionamiento es suministrado a las células, como polinucleótido desnudo, o junto con agentes que facilitan la transfección, tales como liposomas, secuencias virales, partículas virales, virus completos, lipofección, agentes de precipitación, etc., descritos con más detalle más arriba. El promotor P-secuencia de direccionamiento se puede suministrar mediante cualquier método, incluyendo la inyección con aguja directa, la inyección intravenosa, la administración tópica, la infusión con catéter, los aceleradores de partículas, etc. Los métodos se describen con más detalle más abajo.

10 El constructo de promotor-secuencia de direccionamiento es absorbido por las células. La recombinación homóloga entre el constructo y la secuencia endógena tiene lugar, de manera que la secuencia endógena se coloca bajo el control del promotor. A continuación el promotor conduce la expresión de la secuencia endógena.

15 El polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención puede contener una secuencia señal secretora que facilita la secreción de la proteína. Típicamente, la secuencia señal se posiciona en la región codificante del polinucleótido que se va a expresar hacia o en el extremo 5' de la región codificante. La secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga con respecto al polinucleótido de interés y puede ser homóloga o heteróloga con respecto a las células que se van a transfectar. Adicionalmente, la secuencia señal puede ser sintetizada químicamente utilizando métodos conocidos en la técnica.

20 Se puede utilizar cualquier modo de administración de cualquiera de los constructos polinucleotídicos descritos anteriormente con tal que el modo de como resultado la expresión de una o más moléculas en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Esto incluye la inyección con aguja directa, la inyección sistémica, la infusión con catéter, los inyectores biolísticos, los aceleradores de partículas (esto es, "pistolas génicas"), depósitos de esponja Gelfoam, otros materiales de depósito disponibles en el mercado, bombas osmóticas (p. ej., minibombas Alza), formulaciones farmacéuticas sólidas orales (comprimidos o píldoras) o en supositorios, y
25 aplicaciones de decantación o tópicas durante la cirugía. Por ejemplo, la inyección directa de plásmido desnudo precipitado con fosfato de calcio en el hígado de rata o bazo de rata o un plásmido recubierto con proteína en la vena porta ha dado como resultado la expresión génica del gen foráneo en los hígados de rata (Kaneda et al., Science 243:375 (1989)).

30 Un método preferido de administración local es mediante inyección directa. Preferiblemente, una proteína de fusión de albúmina de la presente invención que forma complejo con un vehículo de suministro se administra mediante inyección directa en o localmente dentro de la zona de las arterias. La administración de una composición localmente dentro de la zona de las arterias hace referencia a la inyección de la composición centímetros y preferiblemente, milímetros dentro de las arterias.

35 Otro método de administración local consiste en poner en contacto un constructo polinucleotídico de la presente invención en o alrededor de una herida quirúrgica. Por ejemplo, se puede someter a cirugía un paciente y el constructo polinucleotídico se puede aplicar como recubrimiento sobre la superficie del tejido del interior de la herida o el constructo se puede inyectar en zonas de tejido en el interior de la herida.

40 Las composiciones terapéuticas útiles en la administración sistémica, incluyen proteínas de fusión de la presente invención que forman complejo con un vehículo de suministro dirigido de la presente invención. Los vehículos de suministro adecuados para su uso con la administración sistémica comprenden liposomas que comprenden ligandos para el direccionamiento del vehículo a un sitio concreto. En realizaciones específicas, los vehículos de suministro adecuados para su uso con la administración sistémica comprenden liposomas que comprenden proteínas de fusión de albúmina de la invención para el direccionamiento del vehículo a un sitio concreto.

45 Los métodos preferidos de administración sistémica incluyen el suministro mediante inyección intravenosa, aerosol, oral y percutánea (tópica). Las inyecciones intravenosas se pueden realizar utilizando métodos convencionales en la técnica. El suministro mediante aerosol también se puede realizar utilizando métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992, que se incorpora a la presente memoria como referencia). El suministro oral se puede realizar formando complejo de un constructo de polinucleótido de la presente invención con un portador capaz de resistir la degradación por enzimas digestivas en el
50 intestino de un animal. Los ejemplos de tales portadores incluyen cápsulas de plástico o comprimidos, tales como los conocidos en la técnica. El suministro tópico se puede llevar a cabo mezclando un constructo polinucleotídico de la presente invención con un reactivo lipófilo (p. ej., DMSO) que es capaz de atravesar la piel.

55 La determinación de la cantidad eficaz de sustancia que se va a suministrar puede depender de numerosos factores incluyendo, por ejemplo, la estructura química y la actividad biológica de la sustancia, la edad y el peso del animal, la afección precisa que requiere tratamiento y su gravedad, y la ruta de administración. La frecuencia de los tratamientos depende de numerosos factores, tales como la cantidad de constructos polinucleotídicos administrados por dosis, así como de la salud y el historial del sujeto. La cantidad precisa, el número de dosis, y la programación de las dosis serán determinados por el médico o veterinario a cargo.

Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden administrar a cualquier animal, preferiblemente a mamíferos y aves. Los mamíferos preferidos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas, conejos, ovejas, ganado vacuno, caballos y cerdos, siendo particularmente preferidos los seres humanos.

Actividades biológicas

5 Las proteínas de fusión de albúmina y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención, se pueden utilizar en análisis para someter a ensayo una o más actividades biológicas. Si una proteína de fusión de albúmina y/o polinucleótido muestran una actividad en un análisis concreto, es probable que la proteína terapéutica correspondiente a la proteína de fusión puede estar implicada en las enfermedades asociadas con la actividad biológica. De este modo, la proteína de fusión podría ser utilizada para tratar la enfermedad asociada.

10 En realizaciones preferidas, la presente invención incluye un método para tratar una enfermedad o trastorno que aparece en la columna "Indicación Preferida Y" de la Tabla 1 que comprende la administración a un paciente, en el que se desea dicho tratamiento, prevención o alivio, de una proteína de fusión de albúmina de la invención que comprende una porción de proteína Terapéutica que corresponde a la proteína Terapéutica descrita en la columna "Proteína Terapéutica X" de la Tabla 1 (en la misma fila que la enfermedad o trastorno a tratar se enumera en la columna "Indicación Preferida Y" de la Tabla 1) en una cantidad eficaz para tratar, prevenir o aliviar la enfermedad o trastorno.

15 En una realización preferida adicional, la presente invención abarca un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno enumerados para una proteína Terapéutica particular en la columna "Indicación Preferida: Y" de la Tabla 1 que comprende la administración a un paciente, en el que se desea dicho tratamiento, prevención o alivio, de una proteína de fusión de la albúmina de la invención que comprende una porción de proteína Terapéutica correspondiente a la proteína Terapéutica para la que las indicaciones de los Ejemplos están relacionadas en una cantidad eficaz para tratar, prevenir o aliviar la enfermedad o trastorno.

20 Se contemplan específicamente por la presente invención las proteínas de fusión de albúmina producidas por una célula cuando están codificadas por los polinucleótidos que codifican el SEQ ID NO: Y. Cuando se utilizan estos polinucleótidos para expresar la proteína codificada de una célula, la secreción natural de la célula y las etapas de procesamiento producen una proteína que carece de la secuencia señal que aparece de manera explícita en las columnas 4 y/u 11 de la Tabla 2. La secuencia de aminoácidos específica de la secuencia señal enumerada se muestra en la especificación o es bien conocida en la técnica. Por lo tanto, las realizaciones más preferidas de la presente invención incluyen la proteína de fusión de albúmina producida por una célula (que carecería de la secuencia líder mostrada en las columnas 4 y/u 11 de la Tabla 2). También son muy preferidos los polipéptidos que comprenden el SEQ ID NO: Y sin la secuencia líder específica enumerados en las columnas 4 y/u 11 de la Tabla 2. También se prefieren las composiciones que comprenden estas dos realizaciones preferidas, incluyendo las composiciones farmacéuticas. Estas proteínas de fusión de albúmina se contemplan específicamente para tratar, prevenir, o aliviar una enfermedad o trastorno enumerados para una proteína Terapéutica particular en la columna "Indicación Preferida: Y" de la Tabla 1.

25 En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden utilizar en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos relativos a enfermedades y trastornos del sistema endocrino (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos endocrinos" a continuación), el sistema nervioso (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos neurológicos" a continuación), el sistema inmunitario (véase, por ejemplo, la sección "Actividad inmunitaria" a continuación), el sistema respiratorio (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos respiratorios" a continuación), el sistema cardiovascular (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos cardiovasculares" a continuación), el sistema reproductivo (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos del aparato reproductor" a continuación), el sistema digestivo (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos gastrointestinales" a continuación), las enfermedades y/o trastornos relacionados con la proliferación celular (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos hiperproliferativos" a continuación), y/o las enfermedades o trastornos relacionados con la sangre (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos relacionados con la sangre" a continuación).

30 En ciertas realizaciones, una proteína de fusión de albúmina de la presente invención se pueden utilizar para diagnosticar y/o pronosticar enfermedades y/o trastornos asociados con el tejido o los tejidos en los que se expresa el gen correspondiente a la porción de proteína Terapéutica de la proteína de fusión de la invención.

35 Por lo tanto, las proteínas de fusión de la invención y los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención son útiles en el diagnóstico, detección y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos asociados con actividades que incluyen, pero no se limitan a, la activación prohormonal, la actividad de los neurotransmisores, la señalización celular, la proliferación celular, la diferenciación celular, y la migración celular.

40 De manera más general, las proteínas de fusión de la invención y los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos asociados con los siguientes sistemas.

Actividad inmunitaria

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención, diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades, trastornos y/o afecciones del sistema inmunitario, por ejemplo, mediante la activación o la inhibición de la proliferación, diferenciación o movilización (quimiotaxis) de células inmunitarias. Las células inmunitarias se desarrollan a través de un proceso denominado hematopoyesis, que produce células mieloides (plaquetas, glóbulos rojos, neutrófilos y macrófagos) y linfoides (linfocitos B y T) a partir de células madre pluripotentes. La etiología de estas enfermedades, trastornos y/o afecciones inmunitarias puede ser genética, somática, tal como cáncer y algunas enfermedades autoinmunitaria, adquiridas (por ejemplo, por quimioterapia o toxinas) o infecciosas. Además, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar como un marcador o detector de una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario en particular.

En otra realización, una proteína de fusión de la invención y/o un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmunitario y/o para inhibir o potenciar una respuesta inmunitaria generada por células asociadas con el tejido o los tejidos en los que se expresa el polipéptido de la invención.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención, diagnóstico y/o pronóstico de inmunodeficiencias, incluyendo inmunodeficiencias tanto congénitas como adquiridas. Los ejemplos de inmunodeficiencias de células B en las que los niveles de inmunoglobulina, la función de las células B y/o el número de células B disminuyen incluyen: agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (enfermedad de Bruton), agammaglobulinemia infantil ligada al cromosoma X, inmunodeficiencia ligada al cromosoma X con hiper IgM, inmunodeficiencia no ligada al cromosoma X con hiper IgM, síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP), agammaglobulinemia incluyendo agammaglobulinemia congénita y adquirida, agammaglobulinemia de inicio en la edad adulta, agammaglobulinemia de inicio tardío, disgammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia no especificada, agammaglobulinemia recesiva (tipo Suizo), deficiencia de IgM selectiva, deficiencia de IgA selectiva, deficiencias de subclase IgG selectivas, deficiencia de subclase IgG (con o sin deficiencia de IgA), deficiencia de Ig con el aumento de la deficiencia de IgM, IgG e IgA con aumento de IgM, deficiencia de anticuerpos con Ig normales o elevadas, deleciones de cadenas pesadas de Ig, deficiencia de cadena kappa, trastorno linfoproliferativo de células B (ELPB), inmunodeficiencia variable común (IDCV), inmunodeficiencia variable común (IVC) (adquirida), e hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia.

En realizaciones específicas, la ataxia-telangiectasia o las afecciones asociadas con ataxia-telangiectasia se tratan, previenen, diagnostican, y/o pronostican usando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Los ejemplos de inmunodeficiencias congénitas en la que se reduce la función y/o el número de células T y/o células B incluyen, pero no se limitan a: anomalía de DiGeorge, inmunodeficiencias combinadas graves (IDCG) (incluyendo, pero no limitadas a, IDCG ligada al cromosoma X, IDCG autosómica recesiva, deficiencia de adenosina desaminasa, deficiencia de purina nucleósido fosforilasa (PNP), deficiencia de MHC de Clase II (síndrome de linfocitos desnudos), síndrome de Wiskott-Aldrich, y ataxia telangiectasia), hipoplasia del timo, síndrome de tercera y cuarta bolsa faríngea, delección 22q11.2, candidiasis mucocutánea crónica, deficiencia de células asesinas naturales (NK), linfocitopenia de células T CD4+ idiopática, inmunodeficiencia con defecto de las células T predominante (no especificada), e inmunodeficiencia no especificada de la inmunidad mediada por células.

En realizaciones específicas, la anomalía de DiGeorge o las afecciones asociadas con la anomalía de DiGeorge son tratadas, prevenidas, diagnosticadas, y/o pronosticadas usando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Otras inmunodeficiencias que se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar usando proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, enfermedad granulomatosa crónica, Chediak síndrome de Higashi, deficiencia de mieloperoxidasa, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en leucocitos, síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP), deficiencia de adhesión leucocitaria, deficiencias de componentes del complemento (incluyendo deficiencias de C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 y/o C9), disgenesia reticular, alinoplasia-aplasia del timo, inmunodeficiencia con timoma, leucopenia congénita grave, displasia con inmunodeficiencia, neutropenia neonatal, enanismo de extremidades cortas, y síndrome de Nezelof-inmunodeficiencia combinada con Ig.

En una realización preferida, las inmunodeficiencias y/o afecciones asociadas con las inmunodeficiencias citadas anteriormente son tratadas, prevenidas, diagnosticadas y/o pronosticadas usando proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

En una realización preferida las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención podrían ser utilizadas como un agente para reforzar la inmunosensibilidad

entre los individuos inmunodeficientes. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se podrían utilizar como un agente para reforzar la inmunosensibilidad entre individuos con inmunodeficiencias de células B y/o células T.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención, diagnóstico y/o pronóstico de trastornos autoinmunitarios. Muchos trastornos autoinmunitarios son el resultado de un reconocimiento inadecuado de lo propio como material foráneo por parte de las células inmunitarias. Este reconocimiento inapropiado da como resultado una respuesta inmunitaria que conduce a la destrucción del tejido anfitrión. Por lo tanto, la administración de proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención que pueden inhibir una respuesta inmunitaria, particularmente la proliferación, diferenciación o quimiotaxis de células T, puede ser una terapia eficaz en la prevención de trastornos autoinmunitarios.

Las enfermedades o trastornos autoinmunitarios que se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar por las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica, trombocitopenia, trombocitopenia púrpura autoinmunitaria, trombocitopenia neonatal autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura (por ejemplo, púrpura de Henoch-Schoenlein), autoimmunocitopenia, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar, miastenia grave, enfermedad de Grave (hipertiroidismo), y diabetes mellitus resistente a la insulina.

Otros trastornos adicionales que son propensos a tener un componente autoinmunitario que se puede tratar, prevenir y/o diagnosticar con las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, artritis inducida por colágeno tipo II, síndrome antifosfolípido, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, miocarditis, policondritis recidivante, cardiopatía reumática, neuritis, oftalmia uveítis, poliendocrinopatías, enfermedad de Reiter, síndrome de la persona rígida, inflamación pulmonar autoinmunitaria, autismo, síndrome de Guillain-Barré, diabetes mellitus insulín dependiente, y trastornos oculares inflamatorios autoinmunitarios.

Otros trastornos que son propensos a tener un componente autoinmunitario que se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar con las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, esclerodermia con anticuerpos anti-colágeno (con frecuencia se caracteriza, p. ej., por anticuerpos nucleolares y otros anticuerpos nucleares), enfermedad mixta del tejido conectivo (a menudo se caracteriza, p. ej., por anticuerpos contra antígenos nucleares extraíbles (p. ej., ribonucleoproteína)), polimiositis (a menudo caracterizada, p. ej., por ANA no histónico), anemia perniciosa (a menudo se caracteriza, p. ej., por células anti-parietales, microsomas, y anticuerpos del factor intrínseco), enfermedad idiopática de Addison (a menudo se caracteriza, p. ej., por citotoxicidad adrenal humoral y mediada por células, infertilidad (a menudo caracterizada, p. ej., por anticuerpos antispermatozoicos), glomerulonefritis (con frecuencia caracterizada, p. ej., por anticuerpos de la membrana basal glomerular o complejos inmunitarios), penfigoide ampolloso (a menudo se caracteriza, p. ej., por IgG y complemento en la membrana basal), síndrome de Sjögren (a menudo se caracteriza, p. ej., por anticuerpos de tejidos múltiples, y/o ANA no histónico específico (SS-B)), diabetes mellitus (a menudo se caracteriza, p. ej., por anticuerpos de células de los islotes mediados por células y humoral), y resistencia a fármacos adrenérgicos (incluyendo resistencia a fármacos adrenérgicos con asma o fibrosis quística) (a menudo se caracteriza, p. ej., por anticuerpos contra el receptor beta-adrenérgico).

Otros trastornos que pueden tener un componente autoinmunitario que se puede tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar con las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, hepatitis crónica activa (a menudo caracterizada, p. ej., por anticuerpos de músculo liso), cirrosis biliar primaria (a menudo caracterizada, p. ej., por anticuerpos contra mitocondrias), otra insuficiencia de glándulas endocrinas (a menudo caracterizada, p. ej., por anticuerpos específicos de tejido en algunos casos), vitiligo (a menudo caracterizado, p. ej., por anticuerpos de melanocitos), vasculitis (a menudo caracterizada, p. ej., por Ig y complemento en las paredes de los vasos y/o bajo complemento en suero), post-IM (a menudo caracterizado, p. ej., por anticuerpos antimiocárdicos), síndrome de cardiotomía (a menudo caracterizado, p. ej., por anticuerpos antimiocárdicos), urticaria (a menudo caracterizada, p. ej., por anticuerpos IgG e IgM contra IgE), dermatitis atópica (a menudo caracterizada, p. ej., por anticuerpos IgG e IgM contra IgE), asma (a menudo caracterizada, p. ej., por anticuerpos IgG e IgM contra IgE), y muchos otros trastornos inflamatorios, granulomatosos, degenerativos, y atróficos.

En una realización preferida, las enfermedades autoinmunitarias y los trastornos y/o afecciones asociados con las enfermedades y trastornos indicados anteriormente se tratan, previenen, diagnostican y/o pronostican utilizando, por ejemplo, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención. En una realización preferida específica, la artritis reumatoide se trata, previene y/o diagnostica por medio de las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

En otra realización preferida específica, el lupus eritematoso sistémico se trata, previene y/o diagnostica utilizando las proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención. En otra forma de realización preferida específica, la púrpura trombocitopénica idiopática se trata, previene y/o diagnostica utilizando las proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

5

En otra realización específica preferida la nefropatía por IgA, se trata, previene y/o diagnostica utilizando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

10

En una realización preferida, las enfermedades autoinmunitarias y los trastornos y/o afecciones asociados con las enfermedades y trastornos indicados anteriormente se tratan, previenen, diagnostican y/o pronostican utilizando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como agente o agentes inmunosupresores.

15

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para tratar, prevenir, pronosticar y/o diagnosticar enfermedades, trastornos y/o afecciones de las células hematopoyéticas. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se podrían utilizar para aumentar la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas, incluyendo las células madre pluripotentes, en un esfuerzo para tratar o prevenir las enfermedades, trastornos y/o afecciones asociados con una disminución en ciertos (o muchos) tipos de células hematopoyéticas, incluyendo, pero no limitados a, leucopenia, neutropenia, anemia y trombocitopenia. Alternativamente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se podrían utilizar para aumentar la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas, incluyendo las células madre pluripotentes, en un esfuerzo para tratar o prevenir esas enfermedades, trastornos y/o afecciones asociados con un aumento de ciertos (o muchos) tipos de células hematopoyéticas, incluyendo, pero no limitados a, histiocitosis.

20

25

Las reacciones y afecciones alérgicas, tales como el asma (particularmente el asma alérgica) u otros problemas respiratorios, también se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar utilizando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Además, estas moléculas se pueden utilizar para tratar, prevenir, pronosticar y/o diagnosticar la anafilaxis, la hipersensibilidad a una molécula antigénica, o la incompatibilidad de grupo sanguíneo.

30

Adicionalmente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar reacciones alérgicas mediadas por IgE. Tales reacciones alérgicas incluyen, pero no se limitan a, asma, rinitis y eczema. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para modular las concentraciones de IgE in vitro o in vivo.

35

Por otra parte, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención tienen utilidad en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de las afecciones inflamatorias. Por ejemplo, ya que las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden inhibir la activación, proliferación y/o diferenciación de células implicadas en una respuesta inflamatoria, estas moléculas se pueden utilizar para prevenir y/o tratar afecciones inflamatorias agudas o crónicas. Tales afecciones inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, inflamación asociada con infección (p. ej., choque séptico, sepsis, o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), lesión por isquemia-reperfusión, letalidad por endotoxinas, rechazo hiperagudo mediado por el complemento, nefritis, lesión pulmonar inducida por citoquinas o quimioquinas, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, producción en exceso de citoquinas (p. ej., TNF o IL-1), trastornos respiratorios (p. ej., asma y alergia); trastornos gastrointestinales (p. ej., enfermedad inflamatoria intestinal); cánceres (p. ej., gástrico, de ovario, de pulmón, de vejiga, de hígado y de mama); trastornos del SNC (p. ej., esclerosis múltiple; lesión cerebral isquémica y/o accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática, trastornos neurodegenerativos (p. ej., enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer); demencia relacionada con el SIDA, y enfermedades de priones); trastornos cardiovasculares (p. ej., aterosclerosis, miocarditis, enfermedad cardiovascular y complicaciones de derivación cardiopulmonar); así como muchas otras enfermedades, afecciones y trastornos que se caracterizan por inflamación (p. ej., hepatitis, artritis reumatoide, gota, trauma, pancreatitis, sarcoidosis, dermatitis, lesión renal por isquemia-reperfusión, enfermedad de Grave, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus, y rechazo de trasplante alogénico).

40

45

50

55

Debido a que la inflamación es un mecanismo de defensa fundamental, los trastornos inflamatorios pueden afectar virtualmente a cualquier tejido del cuerpo. Por consiguiente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, tienen utilidad en el tratamiento de trastornos inflamatorios específicos de tejidos, incluyendo, pero no limitados a, adenitis, alveolitis, angiocolecistitis,

apendicitis, balanitis, blefaritis, bronquitis, bursitis, carditis, celulitis, cervicitis, colecistitis, corditis, coclitis, colitis, conjuntivitis, cistitis, dermatitis, diverticulitis, encefalitis, endocarditis, esofagitis, eustaquitis, fibrositis, foliculitis, gastritis, gastroenteritis, gingivitis, glositis, hepatosplenitis, queratitis, laberintitis, laringitis, linfangitis, mastitis, otitis media, meningitis, metritis, mucitis, miocarditis, miositis, miringitis, nefritis, neuritis, orquitis, osteocondritis, otitis, pericarditis, peritendonitis, peritonitis, faringitis, flebitis, poliomieltitis, prostatitis, pulpitis, retinitis, rinitis, salpingitis, escleritis, esclerocoroiditis, escrotitis, sinusitis, espondilitis, esteatitis, estomatitis, sinovitis, siringitis, tendinitis, amigdalitis, uretritis, y vaginitis.

En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, son útiles para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar los rechazos de trasplantes de órganos y la enfermedad de injerto contra anfitrión. El rechazo de órganos se produce por la destrucción de las células inmunitarias del anfitrión del tejido trasplantado a través de una respuesta inmunitaria. Del mismo modo, una respuesta inmunitaria también está implicada en la GVHD, pero, en este caso, las células inmunitarias trasplantadas foráneas destruyen los tejidos del anfitrión. Los polipéptidos, anticuerpos, o polinucleótidos de la invención, y/o los agonistas o antagonistas de los mismos, que inhiben una respuesta inmunitaria, particularmente la activación, proliferación, diferenciación o quimiotaxis de las células T, pueden ser una terapia eficaz en la prevención del rechazo de órganos o GVHD. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, que inhiben una respuesta inmunitaria, particularmente la activación, proliferación, diferenciación o quimiotaxis de células T, pueden ser una terapia eficaz en la prevención rechazo de xenoinjerto alérgico y hiperagudo experimental.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, son útiles para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar enfermedades del complejo inmunitario, incluyendo, pero no limitadas a, enfermedad del suero, glomerulonefritis post-estreptocócica, poliarteritis nodosa, vasculitis inducida por el complejo inmunitario.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para tratar, detectar y/o evitar los agentes infecciosos. Por ejemplo, mediante el aumento de la respuesta inmunitaria, en particular el aumento de la proliferación, activación y/o diferenciación de las células B y/o T, las enfermedades infecciosas pueden ser tratadas, detectadas, y/o prevenidas. La respuesta inmunitaria se puede incrementar potenciando una respuesta inmunitaria existente, o iniciando una nueva respuesta inmunitaria. Alternativamente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden inhibir directamente el agente infeccioso (remitirse a la sección del listado de aplicación de agentes infecciosos, etc.), sin provocar necesariamente una respuesta inmunitaria.

En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un coadyuvante de vacuna que mejora la capacidad de respuesta inmunitaria a un antígeno. En una realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un coadyuvante para potenciar las respuestas inmunitarias específicas de tumores.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un coadyuvante para potenciar las respuestas inmunitarias antivirales. Las respuestas inmunitarias antivirales que se pueden potenciar utilizando las composiciones de la invención como coadyuvante, incluyen virus y enfermedades o síntomas asociados con virus descritos en la presente memoria o conocidos de otra manera en la técnica. En realizaciones específicas, las composiciones de la invención se usan como un adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a un virus, enfermedad, o síntoma seleccionados del grupo que consiste en: SIDA, meningitis, Dengue, EBV, y hepatitis (p. ej., hepatitis B). En otra realización específica, las composiciones de la invención se usan como un coadyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a un virus, enfermedad, o síntoma seleccionados del grupo que consiste en: VIH/SIDA, virus sincitial respiratorio, Dengue, rotavirus, encefalitis B japonesa, influenza A y B, parainfluenza, sarampión, citomegalovirus, rabia, Junin, Chikungunya, fiebre del Valle del Rift, herpes simple y fiebre amarilla.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un coadyuvante para potenciar respuestas inmunitarias antibacterianas o antifúngicas. Las respuestas inmunitarias antibacterianas o antifúngicas que se pueden potenciar utilizando las composiciones de la invención como un coadyuvante, incluyen bacterias u hongos y enfermedades asociadas con bacterias u hongos o síntomas descritos en la presente memoria o conocidos de otra manera en la técnica. En realizaciones específicas, las composiciones de la invención se utilizan como un coadyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a una bacteria u hongo, enfermedad o síntoma seleccionados del grupo que consiste en: tétanos, difteria, botulismo y meningitis tipo B.

En otra realización específica, las composiciones de la invención se utilizan como un coadyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a una bacteria u hongo, enfermedad o síntoma seleccionados del grupo que consiste en: *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium leprae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Neisseria meningitidis*,

Streptococcus pneumoniae, estreptococo del grupo B, *Shigella* spp., *Escherichia coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica, y *Borrelia burgdorferi*.

- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un coadyuvante para potenciar respuestas inmunitarias antiparasitarias. Las respuestas inmunitarias antiparasitarias que se pueden potenciar utilizando las composiciones de la invención como un coadyuvante, incluyen parásitos y enfermedades o síntomas asociados con parásitos descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica. En realizaciones específicas, las composiciones de la invención se utilizan como un coadyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a un parásito. En otra realización específica, las composiciones de la invención se utilizan como un coadyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a Plasmodium (malaria) o Leishmania.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden emplear para el tratamiento de enfermedades infecciosas incluyendo silicosis, sarcoidosis y fibrosis pulmonar idiopática; por ejemplo, mediante la prevención del reclutamiento y la activación de los fagocitos mononucleares.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un antígeno para la generación de anticuerpos para inhibir o potenciar respuestas mediadas por el sistema inmunitario contra polipéptidos de la invención.
- En una realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se administran a un animal (p. ej., ratón, rata, conejo, hámster, cobaya, cerdo, micro-cerdo, pollo, camello, cabra, caballo, vaca, oveja, perro, gato, primate no humano, y ser humano, más preferiblemente ser humano) para reforzar el sistema inmunitario para producir mayores cantidades de uno o más anticuerpos (p. ej., IgG, IgA, IgM, e IgE), para inducir la producción de anticuerpos de mayor afinidad y el cambio de clase de inmunoglobulinas (p. ej., IgG, IgA, IgM e IgE), y/o para aumentar una respuesta inmunitaria.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un estimulador de la respuesta de las células B a los patógenos.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un activador de células T.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un agente que eleva el estado inmunitario de un individuo antes de su recepción de terapias inmunosupresoras.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un agente para inducir anticuerpos de mayor afinidad.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un agente para aumentar las concentraciones de inmunoglobulinas séricas.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un agente para acelerar la recuperación de individuos inmunocomprometidos.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un agente para aumentar la inmunosensibilidad entre las poblaciones de edad y/o los neonatos.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un potenciador del sistema inmunitario antes de, durante, o después del trasplante de médula ósea y/o de otros trasplantes (p. ej., trasplante de órganos alogénico o xenogénico). Con respecto al trasplante, las composiciones de la invención se pueden administrar antes de, concomitante con, y/o después del trasplante. En una realización específica, las composiciones de la invención se administran después del trasplante, antes del comienzo de la recuperación de las poblaciones de células T. En otra realización específica, las composiciones de la invención se administran primero después del trasplante, después del comienzo de la recuperación de las poblaciones de células T, pero antes de la plena recuperación de las poblaciones de células B.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un agente para reforzar la

- 5 inmunosensibilidad entre individuos que tienen una pérdida adquirida de función de las células B. Las afecciones que dan como resultado una pérdida adquirida de función de las células B que se pueden mejorar o tratar mediante la administración de las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, infección por VIH, SIDA, trasplante de médula ósea, y leucemia linfocítica crónica de células B (LLC).
- 10 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un agente para aumentar la inmunosensibilidad entre individuos que tienen una inmunodeficiencia temporal. Las afecciones que dan como resultado una inmunodeficiencia temporal que se puede mejorar o tratar mediante la administración de las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, la recuperación de infecciones virales (p. ej., influenza), afecciones asociadas con la malnutrición, recuperación de mononucleosis infecciosa o afecciones asociadas con estrés, recuperación del sarampión, recuperación de la transfusión de sangre, y recuperación de la cirugía.
- 15 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un regulador de la presentación de antígenos por monocitos, células dendríticas, y/o células B. En una realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención mejoran la presentación de antígenos o suscitan antagonismo sobre la presentación de antígenos in vitro o in vivo. Por otra parte, en realizaciones relacionadas, esta mejora o antagonismo de la presentación de antígenos pueden ser útiles como un tratamiento antitumoral o para modular el sistema inmunitario.
- 20 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un agente para dirigir el sistema inmunitario de un individuo hacia el desarrollo de una respuesta humoral (es decir, TH2) en oposición a una respuesta celular TH1.
- 25 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un medio para inducir la proliferación de tumores y por lo tanto hacerlos más susceptible a los agentes anti-neoplásicos. Por ejemplo, el mieloma múltiple es una enfermedad de división lenta y por lo tanto refractaria a prácticamente todos los regímenes antineoplásicos. Si estas células se ven obligadas a proliferar más rápidamente su perfil de susceptibilidad probablemente cambiará.
- 30 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un estimulador de la producción de células B en patologías tales como el SIDA, el trastorno de linfocitos crónico y/o la Inmunodeficiencia Variable Común.
- 35 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como una terapia para la generación y/o regeneración de tejidos linfoides después de cirugía, traumatismo o defecto genético. En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan en el tratamiento previo de muestras de médula ósea antes del trasplante.
- 40 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como una terapia basada en genes para trastornos heredados genéticamente que dan como resultado inmuno-incompetencia/inmunodeficiencia tales como las observadas entre pacientes con IDCG.
- 45 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un medio de activación de monocitos/macrófagos para la defensa contra enfermedades parasitarias que afectan a los monocitos tales como Leishmania.
- 50 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un medio de regulación de las citoquinas secretadas que son provocadas por los polipéptidos de la invención.
- 55 En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan en una o más de las aplicaciones descritas en la presente memoria, ya que pueden aplicarse a la medicina veterinaria.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un medio para bloquear diversos aspectos de las respuestas inmunitarias a agentes foráneos o propios. Los ejemplos de las enfermedades o afecciones en las que se puede desearse el bloqueo de algunos aspectos de las respuestas inmunitarias incluyen

trastornos autoinmunitarios tales como lupus y artritis, así como inmunosensibilidad a las alergias de la piel, inflamación, enfermedad del intestino, lesión y enfermedades/trastornos asociados con patógenos.

5 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como una terapia para la prevención de la proliferación de células B y la secreción de Ig asociada con enfermedades autoinmunitarias tales como púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple.

10 En otra realización específica, los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos y/o agonistas o antagonistas de las presentes proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un inhibidor de la migración de células B y/o T en las células endoteliales. Esta actividad perturba la arquitectura del tejido o las respuestas afines y es útil, por ejemplo en la interrupción de la respuesta inmunitaria, y el bloqueo de la sepsis.

15 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como una terapia para la hipergammaglobulinemia crónica evidente en enfermedades tales como la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), enfermedad de Waldenstrom, gammapatías monoclonales idiopáticas relacionadas y plasmacitomas.

20 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden emplear por ejemplo para inhibir la quimiotaxis de polipéptidos y la activación de macrófagos y sus precursores, y de neutrófilos, basófilos, linfocitos B y algunos subconjuntos de células T, p. ej., células T activadas y CD8 citotóxicas y células asesinas naturales, en cierta enfermedades autoinmunitarias e infecciosas e inflamatorias crónicas. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias se describen en la presente memoria e incluyen la esclerosis múltiple, y la diabetes dependiente de insulina.

25 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden emplear para tratar el síndrome hiper-eosinofílico idiopático, por ejemplo, previniendo la producción y la migración de eosinófilos.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para mejorar o inhibir la lisis celular mediada por el complemento.

30 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para mejorar o inhibir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

35 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden emplear para el tratamiento de la aterosclerosis, por ejemplo, mediante la prevención de la infiltración de monocitos en la pared arterial.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden emplear para tratar el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA).

40 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para estimular la reparación de heridas y tejidos, estimular la angiogénesis, y/o estimular la reparación de enfermedades o trastornos vasculares o linfáticos. Además, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para estimular la regeneración de superficies mucosas.

45 En una realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para diagnosticar, pronosticar, tratar y/o prevenir un trastorno caracterizado por inmunodeficiencia primaria o adquirida, producción deficiente de inmunoglobulina en suero, infecciones recurrentes y/o disfunción del sistema inmunitario. Además, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para tratar o prevenir infecciones de las articulaciones, huesos, piel, y/o glándulas parótidas, infecciones transmitidas por la sangre (p. ej., sepsis, meningitis séptica, artritis, y/o osteomielitis), enfermedades autoinmunitarias (p. ej., los descritos en la presente memoria), trastornos inflamatorios, y neoplasias malignas, y/o cualquier enfermedad o trastorno o afección asociados con estas infecciones, enfermedades, trastornos y/o neoplasias malignas) incluyendo, pero no limitados a, IDCV, otras inmunodeficiencias inmunitarias primarias, enfermedad de VIH, LLC, bronquitis recurrente, sinusitis, otitis media, conjuntivitis, neumonía, hepatitis, meningitis, herpes zoster (p. ej., herpes zoster grave), y/o Pneumocystis carinii. Otras enfermedades y trastornos que se pueden prevenir, diagnosticar, pronosticar, y/o tratar con proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican

55

las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, infección por VIH, infección por HTLV-BLV, linfopenia, anemia por disfunción de los fagocitos bactericidas, trombocitopenia y hemoglobinuria.

En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para tratar y/o diagnosticar a un individuo que tiene una enfermedad de inmunodeficiencia variable común ("IDCV", también conocida como "agammaglobulinemia adquirida" e "hipogammaglobulinemia adquirida") o un subconjunto de esta enfermedad.

En una realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar cánceres o neoplasmas incluyendo cánceres o neoplasmas de células inmunitarias incluyendo o relacionados con tejido inmunitario. Los ejemplos de los cánceres o neoplasmas que se pueden prevenir, diagnosticar o tratar por proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, anemia linfocítica aguda (ALL) leucemia linfocitaria crónica, plasmacitomas, mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, enfermedades transformadas por EBV, y/o enfermedades y trastornos descritos en la sección titulada "Trastornos hiperproliferativos" en la presente memoria.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como una terapia para disminuir la proliferación celular de linfomas de células B grandes.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan como un medio de disminuir la implicación de las células B y de las Ig asociadas con la leucemia mielógena crónica.

En realizaciones específicas, las composiciones de la invención se usan como un agente para aumentar la inmunosensibilidad entre individuos con inmunodeficiencias de células B, tales como, por ejemplo, un individuo que se ha sometido a una esplenectomía parcial o completa.

Trastornos relacionados con la sangre

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para modular la actividad hemostática (detención del sangrado) o trombolítica (disolución de coágulos). Por ejemplo, mediante el aumento de la actividad hemostática o trombolítica, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se podrían utilizar para tratar o prevenir enfermedades, trastornos y/o afecciones de la coagulación sanguínea (p. ej., afibrinogenemia, deficiencias de factores, hemofilia), enfermedades, trastornos y/o afecciones de las plaquetas de la sangre (p. ej., trombocitopenia), o las heridas resultantes de trauma, cirugía u otras causas. Alternativamente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención que pueden disminuir la actividad hemostática o trombolítica podrían utilizarse para inhibir o disolver la coagulación. Estas moléculas podrían ser importantes en el tratamiento o la prevención de ataques al corazón (infarto), accidentes cerebrovasculares o cicatrización.

En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para prevenir, diagnosticar, pronosticar y/o tratar la trombosis, trombosis arterial, trombosis venosa, trombo embolia, embolia pulmonar, aterosclerosis, infarto de miocardio, ataque isquémico transitorio, angina inestable. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para la prevención de la oclusión de los injertos de safena, para reducir el riesgo de trombosis periprocedimental como la que podría acompañar a los procedimientos de angioplastia, para reducir el riesgo de accidentes cerebrovasculares en pacientes con fibrilación auricular incluyendo fibrilación auricular no reumática, para reducir el riesgo de embolia asociado con enfermedad mecánica de las válvulas cardíacas y las válvulas mitrales. Otros usos para las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, la prevención de oclusiones en dispositivos extracorpóreos (p. ej., cánulas intravasculares, shunts de acceso vascular en pacientes de hemodiálisis, máquinas de hemodiálisis, y máquinas de derivación cardiopulmonar).

En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para prevenir, diagnosticar, pronosticar, y/o tratar enfermedades y trastornos de la sangre y/u órganos formadores de sangre asociados con el tejido o los tejidos en los que se expresa el polipéptido de la invención.

Las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para modular la actividad hematopoyética (la formación de células sanguíneas). Por ejemplo, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para aumentar la cantidad de todas o de subconjuntos de células sanguíneas, tales como, por ejemplo, eritrocitos, linfocitos (células B o T), células mieloides (p. ej., basófilos,

- eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, macrófagos) y plaquetas. La capacidad de disminuir la cantidad de células sanguíneas o subconjuntos de células sanguíneas puede ser útil en la prevención, detección, diagnóstico y/o tratamiento de anemias y leucopenias descritas a continuación. Alternativamente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para disminuir la cantidad de todas o de subconjuntos de células sanguíneas, tales como, por ejemplo, eritrocitos, linfocitos (células B o T), células mieloides (p. ej., basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, macrófagos) y plaquetas. La capacidad de disminuir la cantidad de células sanguíneas o subconjuntos de células sanguíneas puede ser útil en la prevención, detección, diagnóstico y/o tratamiento de leucocitosis, tal como, por ejemplo la eosinofilia.
- Las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para prevenir, tratar, o diagnosticar la discrasia sanguínea.
- Las anemias son las afecciones en las que el número glóbulos rojos de la sangre o la cantidad de hemoglobina (la proteína que transporta el oxígeno) en ellos está por debajo de lo normal. La anemia puede estar causada por sangrado excesivo, disminución de la producción de glóbulos rojos, o aumento de la destrucción de glóbulos rojos (hemólisis). Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para tratar, prevenir y/o diagnosticar anemias. Las anemias que se pueden tratar, prevenir, o diagnosticar por medio de las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen la anemia por deficiencia de hierro, anemia hipocrómica, anemia microcítica, clorosis, anemia sideroblástica hereditaria, anemia sideroblástica adquirida idiopática, aplasia de glóbulos rojos, anemia megaloblástica (p. ej., anemia perniciosa, (deficiencia de vitamina B12) y anemia por deficiencia de ácido fólico), anemia aplásica, anemias hemolíticas (p. ej., anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica microangiopática y hemoglobinuria paroxística nocturna). Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para tratar, prevenir y/o diagnosticar anemias asociadas con enfermedades incluyendo, pero no limitadas a, anemias asociadas con lupus eritematoso sistémico, cánceres, linfomas, enfermedad renal crónica y bazo agrandados. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para tratar, prevenir y/o diagnosticar anemias derivadas de tratamientos con fármacos tales como las anemias asociadas con metildopa, dapsona y/o sulfonamidas. Además, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para tratar, prevenir y/o diagnosticar anemias asociadas con la arquitectura anormal de los glóbulos rojos incluyendo, pero no limitadas a, esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y anemia de células falciformes.
- Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para tratar, prevenir y/o diagnosticar anomalías de la hemoglobina, (p. ej., las asociadas con anemia de células falciformes, enfermedad de la hemoglobina C, enfermedad de la hemoglobina S-C, y enfermedad de la hemoglobina E). Además, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de las talasemias, incluyendo, pero no limitadas a, las formas mayor y menor de alfa-talasemia y beta-talasemia.
- En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de trastornos de la coagulación que incluyen, pero no se limitan a, trombocitopenia (p. ej., púrpura trombocitopénica idiopática y púrpura trombocitopénica trombótica), enfermedad de Von Willebrand, trastornos plaquetarios hereditarios (p. ej., enfermedad de almacenamiento del pool, tales como síndromes de Chediak-Higashi y Hermansky-Pudlak, disfunción del tromboxano A2, tromboastenia, y síndrome de Bernard-Soulier), síndrome hemolítico hemolítico-urémico, hemofilias tales como hemofilia A o deficiencia de Factor VII y enfermedad de Christmas o deficiencia de Factor IX, Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria, también conocida como síndrome de Rendu-Osler-Weber, púrpura alérgica (púrpura de Henoch Schonlein) y coagulación intravascular diseminada.
- El efecto de las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención sobre el tiempo de coagulación de la sangre puede ser controlado usando cualquiera de las pruebas de coagulación conocidas en la técnica incluyendo, pero no limitadas a, tiempo de tromboplastina parcial de sangre completa (TTP), el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), el tiempo de coagulación activado (TCA), el tiempo de coagulación activado recalcificado, o el tiempo de coagulación Lee-White.
- Varias enfermedades y una variedad de medicamentos pueden causar disfunción plaquetaria. Por lo tanto, en una realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de la disfunción plaquetaria adquirida tal como la disfunción de plaquetas que acompaña a la insuficiencia renal, la leucemia, el mieloma múltiple, la cirrosis hepática, y el lupus eritematoso sistémico, así como la disfunción plaquetaria asociada con los tratamientos con fármacos, incluyendo el tratamiento con aspirina,

ticlopidina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (utilizados para la artritis, el dolor y los esguinces), y penicilina en dosis altas.

En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por o asociados con el aumento o disminución del número de glóbulos blancos de la sangre. La leucopenia se produce cuando el número de glóbulos blancos de la sangre disminuye por debajo del normal. Las leucopenias incluyen, pero no se limitan a, neutropenia y linfocitopenia. Un aumento en el número de glóbulos blancos de la sangre en comparación con el normal se conoce como leucocitosis. El organismo genera un mayor número de glóbulos blancos de la sangre durante la infección. Por lo tanto, la leucocitosis puede ser simplemente un parámetro fisiológico normal que refleja infección. Alternativamente, la leucocitosis puede ser un indicador de lesión o de otra enfermedad tal como cáncer. Las leucocitosis, incluyen, pero no se limitan a, eosinofilia y acumulación de macrófagos. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de la leucopenia. En otras realizaciones específicas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de la leucocitosis.

La leucopenia puede ser una disminución generalizada de todos los tipos de glóbulos blancos de la sangre, o puede ser un agotamiento específico de determinados tipos de glóbulos blancos de la sangre. Por lo tanto, en realizaciones específicas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de la disminución en el número de neutrófilos, conocida como neutropenia. Las neutropenias que se pueden diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar por medio de las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, agranulocitosis genética infantil, neutropenia familiar, neutropenia cíclica, neutropenias resultantes de o asociadas con deficiencias en la dieta (p. ej., deficiencia de vitamina B12 o deficiencia de ácido fólico), neutropenias resultantes de o asociadas con los tratamientos farmacológicos (p. ej., regímenes de antibióticos como tratamiento con penicilina, tratamiento con sulfonamida, tratamiento con anticoagulantes, fármacos anticonvulsivos, fármacos antitiroideos y quimioterapia contra el cáncer), y neutropenias resultantes del aumento de la destrucción de neutrófilos que puede ocurrir en asociación con algunas infecciones bacterianas o virales, trastornos alérgicos, enfermedades autoinmunitarias, afecciones en las que un individuo tiene un agrandamiento del bazo (p. ej., síndrome de Felty, malaria y sarcoidosis), y algunos regímenes de tratamiento con fármacos.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de linfocitopenias (disminución del número de linfocitos B y/o T), incluyendo, pero no limitadas a, linfocitopenias resultantes de o asociadas con el estrés, tratamientos farmacológicos (p. ej., tratamiento farmacológico con corticosteroides, quimioterapias de cáncer, y/o terapia de radiación), infección por SIDA y/u otras enfermedades tales como, por ejemplo, cáncer, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, infecciones crónicas, algunas infecciones virales y/o trastornos hereditarios (p. ej., síndrome de DiGeorge, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada severa, ataxia telangiectasia).

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con el número de macrófagos y/o la función de los macrófagos, incluyendo, pero no limitados a, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-pick, enfermedad de Letterer-Siwe y enfermedad de Hand-Schuller-Christian.

En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con el número de eosinófilos y/o la función de los eosinófilos, incluyendo, pero no limitados a, síndrome hipereosinofílico idiopático, síndrome de eosinofilia-mialgia y enfermedad de Hand-Schuller-Christian.

En otra realización más, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de leucemias y linfomas, incluyendo, pero no limitados a, leucemia linfocítica (linfoblástica) aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (mielocítica, mielógena, mieloblástica, o mielomonocítica), leucemia linfocítica crónica (p. ej., leucemias de células B, leucemias de células T, síndrome de Sezary, y leucemia de células pilosas), leucemia mielocítica crónica (mieloide, mielógena o granulocítica), linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, y micosis fungoide.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos de células plasmáticas, incluyendo, pero no limitados a, discrasias de

células plasmáticas, gammapatías monoclonales, gammapatías monoclonales de significado incierto, mieloma múltiple, macroglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenstrom, crioglobulinemia, y fenómeno de Raynaud.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de trastornos mieloproliferativos, incluyendo, pero no limitados a, policitemia vera, policitemia relativa, policitemia secundaria, mielofibrosis, mielofibrosis aguda, metaplasia mielode agnógena, trombocitemia, (incluyendo trombocitemia tanto primaria como secundaria) y leucemia mieloide crónica.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles como tratamiento antes de la cirugía, para aumentar la producción de células sanguíneas.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles como agente para mejorar la migración, fagocitosis, producción de superóxido, citotoxicidad celular dependiente anticuerpos de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles como agente para aumentar el número de células madre en circulación antes de la fésis de células madre. En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles como agente para aumentar el número de células madre en circulación antes de la fésis de plaquetas.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles como agente para aumentar la producción de citoquinas.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de trastornos hematopoyéticos primarios.

Trastornos hiperproliferativos

En ciertas realizaciones, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para tratar o detectar trastornos hiperproliferativos, incluyendo neoplasmas. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden inhibir la proliferación del trastorno a través de interacciones directas o indirectas. Alternativamente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden hacer proliferar otras células que pueden inhibir el trastorno hiperproliferativo.

Por ejemplo, mediante el aumento de una respuesta inmunitaria, particularmente aumentando las cualidades antigénicas del trastorno hiperproliferativo o mediante la proliferación, diferenciación, o movilización de células T, se pueden tratar los trastornos hiperproliferativos. Esta respuesta inmunitaria se puede aumentar o bien potenciando una respuesta inmunitaria existente o bien iniciando una nueva respuesta inmunitaria. Alternativamente, la disminución de una respuesta inmunitaria puede ser también un método de tratamiento de trastornos hiperproliferativos, tales como un agente quimioterapéutico.

Los ejemplos de trastornos hiperproliferativos que se pueden tratar o detectar mediante las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a neoplasmas localizados en el: colon, abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenal, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, tórax y tracto urogenital.

De manera similar, otros trastornos hiperproliferativos también se pueden tratar o detectar mediante las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Los ejemplos de tales trastornos hiperproliferativos incluyen, pero no se limitan a: Leucemia linfoblástica aguda infantil, Leucemia linfoblástica aguda, Leucemia linfocítica aguda, Leucemia mieloide aguda, Carcinoma adrenocortical, Cáncer hepatocelular en adulto (Primario), Cáncer de hígado en adulto (Primario), Leucemia linfocítica aguda en adulto, Leucemia mieloide aguda en adulto, enfermedad de Hodgkin en adulto, Linfoma de Hodgkin en adulto, Leucemia linfocítica en adulto, Linfoma de no Hodgkin en adulto, Cáncer de hígado primario en adulto, Sarcoma de tejido blando en adulto, Linfoma relacionado con SIDA, Neoplasias malignas relacionadas con SIDA, Cáncer anal, Astrocitoma, Cáncer de la vesícula biliar, Cáncer de vejiga, Cáncer de hueso, Glioma del tronco cerebral, Tumores cerebrales, Cáncer de mama, Cáncer de la pelvis renal y el uréter, Linfoma del sistema nervioso central (primario), Linfoma del sistema nervioso central, Astrocitoma cerebeloso, Astrocitoma cerebral, Cáncer de cuello de útero,

Cáncer hepatocelular infantil (primario), Cáncer de hígado infantil (primario), Leucemia linfoblástica aguda infantil, Leucemia mieloide aguda infantil, Glioma del tronco encefálico, Astrocitoma cerebeloso infantil, Astrocitoma cerebral infantil, Tumores de células germinales extracraneales infantiles, Enfermedad de Hodgkin infantil, Linfoma de Hodgkin infantil, Glioma hipotalámico y de la ruta visual infantil, Leucemia linfoblástica infantil, Meduloblastoma infantil, Linfoma no Hodgkin infantil, Tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, y pineales infantiles, Cáncer de hígado primario infantil, Rbdomiosarcoma infantil, Sarcoma de tejido blando infantil, Glioma hipotalámico y de la ruta visual infantil, Leucemia linfocítica crónica, Leucemia mielógena crónica, Cáncer de colon, Linfoma de células T cutáneo, Carcinoma endocrino de células de los islotes de páncreas, Cáncer endometrial, Ependimoma, Cáncer epitelial, Cáncer de esófago, Sarcoma de Ewing y tumores relacionados, Cáncer pancreático exocrino, Tumor de células germinales extracraneales, Tumor de células germinales extragonadales, Cáncer del conducto biliar extrahepático, Cáncer de ojo, Cáncer de mama femenino, Enfermedad de Gaucher, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer gástrico, Tumor carcinoide gastrointestinal, Tumores gastrointestinales, Tumores de células germinales, Tumor trofoblástico gestacional, Leucemia de células pilosas, Cáncer de cabeza y cuello, Cáncer hepatocelular, Enfermedad de Hodgkin, Linfoma de Hodgkin, Hipergammaglobulinemia, Cáncer de hipofaringe, Cánceres intestinales, Melanoma intraocular, Carcinoma de células de los islotes, Cáncer de pancreático de células de los islotes, Sarcoma de Kaposi, Cáncer de riñón, Cáncer de laringe, Cáncer del labio y la cavidad oral, Cáncer de hígado, Cáncer de pulmón, Trastornos linfoproliferativos, Macroglobulinemia, Cáncer de mama masculino, Mesotelioma maligno, Timoma maligno, Meduloblastoma, Melanoma, Mesotelioma, Cáncer de cuello escamoso primario oculto metastásico, Cáncer de cuello escamoso primario metastásico, Cáncer de cuello escamoso metastásico, Mieloma múltiple, Mieloma múltiple/neoplasma de células de plasma, Síndrome mielodisplásico, Leucemia mielógena, Leucemia mieloide, Trastornos mieloproliferativos, Cáncer de la cavidad nasal y los senos paranasales, Cáncer de la nasofaringe, Neuroblastoma, Linfoma no Hodgkin durante el embarazo, Cáncer de piel distinto de melanoma, Cáncer de pulmón de células no pequeñas, Cáncer de cuello escamoso metastásico primario oculto, Cáncer de la orofaringe, Osteosarcoma fibroso maligno, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno del hueso, Cáncer epitelial de ovario, Tumor de células germinales de ovario, Tumor de bajo potencial maligno de ovario, Cáncer de páncreas, Paraproteinemias, Púrpura, Cáncer de paratiroides, Cáncer de pene, Feocromocitoma, Tumor de la hipófisis, Neoplasma de células plasmáticas/mieloma múltiple, Linfoma del sistema nervioso central primario, Cáncer de hígado primario, Cáncer de próstata, Cáncer de recto, Cáncer de células renales, Cáncer de pelvis renal y uréter, Retinoblastoma, Rbdomiosarcoma, Cáncer de glándula salival, Sarcoidosis, Sarcomas, Síndrome de Sezary, Cáncer de piel, Cáncer de pulmón de células pequeñas, Cáncer del intestino delgado, Sarcoma de tejido blando, Cáncer de cuello escamoso, Cáncer de estómago, Tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineales, Linfoma de células T, Cáncer testicular, Timoma, Cáncer de tiroides, Cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter, Cáncer de transición de la pelvis renal y el uréter, Tumores trofoblásticos, Cáncer de células del uréter y pelvis renal, Cáncer de la uretra, Cáncer uterino, Sarcoma uterino, Cáncer vaginal, Glioma de las rutas ópticas y del hipotálamo, Cáncer de vulva, Macroglobulinemia de Waldenstrom, Tumor de Wilms, y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de las neoplasias, situada en un sistema de órganos enumerado anteriormente.

En otra realización preferida, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar afecciones premalignas y para prevenir la progresión a un estado neoplásico o maligno, incluyendo, pero no limitado a los trastornos descritos anteriormente. Tales usos están indicados en las afecciones que se sabe o sospecha que preceden la progresión a neoplasia o cáncer, en particular, cuando el crecimiento de células no neoplásicas consiste en hiperplasia, metaplasia, o más particularmente, se ha producido displasia (para una revisión de tales afecciones de crecimiento anormal, véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2ª Ed., WB Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-79).

La hiperplasia es una forma de proliferación celular controlada, que implica un aumento en el número de células en un tejido u órgano, sin alteración significativa en la estructura o función. Los trastornos hiperplásicos que se pueden diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar con proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, hiperplasia de los ganglios linfáticos mediastinal angiofolicular, hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia, hiperplasia de melanocitos atípica, hiperplasia de células basales, hiperplasia gigante benigna de los ganglios linfáticos, hiperplasia del cemento, hiperplasia suprarrenal congénita, hiperplasia congénita sebácea, hiperplasia quística, hiperplasia quística de la mama, hiperplasia de la dentadura, hiperplasia ductal, hiperplasia endometrial, hiperplasia fibromuscular, hiperplasia epitelial focal, hiperplasia gingival, hiperplasia fibrosa inflamatoria, hiperplasia papilar inflamatoria, hiperplasia endotelial papilar intravascular, hiperplasia nodular de la próstata, hiperplasia nodular regenerativa, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, hiperplasia sebácea senil, e hiperplasia verrucosa.

La metaplasia es una forma de crecimiento celular controlado en la que un tipo de células adultas o completamente diferenciadas sustituye a otro tipo de célula adulta. Los trastornos metaplásicos que se pueden diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar con proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, metaplasia mieloide agnogénica, metaplasia apocrina, metaplasia atípica, metaplasia autoparenquimatosa, metaplasia del tejido conectivo, metaplasia epitelial, metaplasia intestinal, anemia metaplásica, osificación metaplásica, pólipos metaplásicos, metaplasia mieloide,

metaplasia mieloide primaria, metaplasia mieloide secundaria, metaplasia escamosa, metaplasia escamosa del amnios, y metaplasia mieloide sintomática.

La displasia es frecuentemente un precursor del cáncer, y se encuentra principalmente en los epitelios; es la forma más desordenada de crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida en la uniformidad celular individual y en la orientación arquitectónica de las células. Las células displásicas a menudo tienen núcleos anormalmente grandes, profundamente teñidos, y exhiben pleomorfismo. La displasia se produce característicamente cuando existe una irritación o inflamación crónicas. Los trastornos displásicos que se pueden diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, displasia ectodérmica anhidrótica, displasia anterofacial, displasia torácica asfixiante, displasia atriopulmonar, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia cervical, displasia condroectodérmica, displasia cleidocraneal, displasia ectodérmica congénita, displasia craneodifisaria, displasia craneocarpotarsal, displasia craneometatarsaria, displasia dentina, displasia diafisaria, displasia ectodérmica, displasia del esmalte, displasia encéfalo-oftálmica, displasia epifisaria hemimélica, displasia epifisaria múltiple, displasia epifisaria punctata, displasia epitelial, displasia faciodigitogenital, displasia fibrosa familiar de mandíbulas, displasia familiar de pliegues blancos, displasia fibromuscular, displasia fibrosa, displasia ósea florida, displasia renal-retiniana hereditaria, displasia ectodérmica hidrótica, displasia ectodérmica hipohidrótica, displasia tímica linfopénica, displasia mamaria, displasia mandibulofacial, displasia metatarsaria, displasia de Mondini, displasia fibrosa monostótica, displasia mucoepitelial, displasia epifisaria múltiple, displasia oculoauriculovertebral, displasia oculodentodigital, displasia oculovertebral, displasia odontogénica, displasia oftalmomandibulomélica, displasia del cemento periapical, displasia fibrosa poliostótica, displasia espondiloepifisaria pseudocondroplásica, displasia de retina, displasia septo-óptica, displasia espondiloepifisaria, y displasia ventriculorradiar.

Los trastornos pre-neoplásicos adicionales que se pueden diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, trastornos disproliferativos benignos (p. ej., tumores benignos, afecciones fibroquísticas, hipertrofia del tejido, pólipos intestinales, pólipos en el colon, y displasia esofágica), leucoplasia, queratosis, enfermedad de Bowen, Piel del granjero, queratitis solar, y la queratosis solar.

En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para diagnosticar y/o pronosticar trastornos asociados con el tejido o los tejidos en los que se expresa el polipéptido de la invención.

En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención conjugados con una toxina o un isótopo radiactivo, como se describe en la presente memoria, se pueden utilizar para tratar cánceres y neoplasmas, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la presente memoria. En una realización preferida adicional, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención conjugados con una toxina o un isótopo radiactivo, como se describe en la presente memoria, se pueden utilizar para tratar la leucemia mielógena aguda.

Además, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden afectar a la apoptosis, y por lo tanto, serían útiles en el tratamiento de numerosas enfermedades asociadas con el aumento de la supervivencia celular o la inhibición de la apoptosis. Por ejemplo, las enfermedades asociadas con el aumento de la supervivencia celular o la inhibición de la apoptosis que podrían ser diagnosticadas, pronosticadas, prevenidas y/o tratadas mediante los polinucleótidos, polipéptidos, y/o agonistas o antagonistas de la invención, incluyen cánceres (tales como linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53 y tumores dependientes de hormonas, incluyendo, pero no limitados a cáncer de colon, tumores cardíacos, cáncer pancreático, melanoma, retinoblastoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer intestinal, cáncer testicular, cáncer de estómago, neuroblastoma, mixoma, mioma, linfoma, endotelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteosarcoma, condrosarcoma, adenoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, sarcoma de Kaposi y cáncer de ovario); trastornos autoinmunitarios tales como, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis relacionada con el sistema inmunitario y artritis reumatoide) e infecciones virales (tales como virus del herpes, virus de la viruela y adenovirus), inflamación, enfermedad de injerto v. anfitrión, rechazo agudo de injerto, y rechazo crónico de injerto.

En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para inhibir el crecimiento, la progresión y/o la metástasis de cánceres, en particular de los mencionados anteriormente.

Otras enfermedades o afecciones asociadas con el aumento de la supervivencia celular que podrían ser diagnosticadas, pronosticadas, prevenidas y/o tratadas mediante proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, progresión y/o metástasis de neoplasias malignas y trastornos relacionados tales como leucemia (incluyendo leucemias agudas (p. ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluyendo leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (p. ej., leucemia mielocítica

(granulocítica) crónica y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada y tumores sólidos incluyendo, pero no limitados a, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, emangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma.

Las enfermedades asociadas con el aumento de la apoptosis que podrían ser diagnosticadas, pronosticadas prevenidas y/o tratadas mediante las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen SIDA; trastornos neurodegenerativos (tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelar y tumor cerebral o enfermedad asociada con priones); trastornos autoinmunitarios (tales como, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis relacionada con el sistema inmunitario y artritis reumatoide) síndromes mielodisplásicos (tales como anemia aplásica), enfermedad de injerto v. anfitrión, lesión isquémica (tal como la causada por infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y lesión por reperfusión), lesión de hígado (p. ej., lesión hepática relacionada con hepatitis, lesión por isquemia/reperfusión, colestosis (lesión de los conductos biliares) y cáncer de hígado); enfermedad del hígado inducida por toxinas (tales como las causadas por el alcohol), choque séptico, caquexia y anorexia.

Las enfermedades y/o trastornos hiperproliferativos que podrían ser diagnosticados, pronosticados, prevenidos y/o tratados mediante las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, neoplasmas situados en el hígado, abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenal, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, tórax y tracto urogenital.

De manera similar, otros trastornos hiperproliferativos también pueden ser diagnosticados, pronosticados, prevenidos y/o tratados mediante las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Los ejemplos de tales trastornos hiperproliferativos incluyen, pero no se limitan a: hipergammaglobulinemia, trastornos linfoproliferativos, paraproteinemias, púrpura, sarcoidosis, síndrome de Sezary, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de Gaucher, histiocitosis y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, localizada en un sistema de órganos enumerado anteriormente.

Otra realización preferida utiliza polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención para inhibir la división celular aberrante, mediante terapia génica utilizando la presente invención, y/o fusiones de proteínas o fragmentos de las mismas.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para tratar trastornos de proliferación celular insertando en una célula en proliferación anormal un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, en donde dicho polinucleótido reprime dicha expresión.

Otra realización de la presente invención proporciona un método de tratamiento de trastornos de proliferación de células en individuos que comprende la administración de una o más copias de genes activos de la presente invención a una célula o células que proliferan anormalmente. En una realización preferida, los polinucleótidos de la presente invención son un constructo de ADN que comprende un vector de expresión recombinante eficaz para expresar una secuencia de ADN que codifica dichos polinucleótidos. En otra realización preferida de la presente invención, el constructo de ADN que codifica la proteína de fusión de la presente invención se introduce en las células a tratar utilizando un retrovirus, o más preferiblemente un vector adenoviral (Véase G J. Nabel, et. al., PNAS 1999 96: 324-326, que se incorpora a la presente memoria como referencia). En una realización muy preferida, el vector viral es defectuoso y no transformará las células que no están en proliferación, solamente las células que están en proliferación. Además, en una realización preferida, los polinucleótidos de la presente invención insertados en células en proliferación, ya sean solos, o combinados o fusionados con otros polinucleótidos, pueden ser modulados a través de un estímulo externo (es decir, magnético, específico de molécula pequeña, producto químico, o administración de fármaco, etc.), que actúa sobre el promotor aguas arriba de dichos polinucleótidos para inducir la expresión del producto proteico codificado. Como tal, el efecto terapéutico beneficioso de la presente invención puede ser modulado expresamente (es decir, para aumentar, disminuir o inhibir la expresión de la presente invención) basándose en dicho estímulo externo.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden ser útiles en la represión de la expresión de los genes oncogénicos o antígenos. Por "reprimir la expresión de los genes oncogénicos" se quiere significar la supresión de la transcripción del gen, la degradación del transcrito génico (pre-ARN mensajero), la inhibición del corte y empalme, la destrucción del ARN mensajero, la prevención de las modificaciones post-traduccionales de la proteína, la destrucción de la proteína, o la inhibición de la función normal de la proteína.

Para la administración local a células que proliferan anormalmente, los polinucleótidos de la presente invención se pueden administrar por cualquier método conocido por los expertos en la técnica incluyendo, pero no limitado a transfección, electroporación, microinyección de células, o en vehículos tales como liposomas, lipofectina, o en forma de polinucleótidos desnudos, o cualquier otro método descrito en toda la memoria descriptiva. El polinucleótido de la presente invención se puede suministrar por sistemas de suministro de genes conocidos tales como, pero no limitados a, vectores retrovirales (Gilboa, J. Virology 44: 845 (1982); Hocke, Nature 320: 275 (1986); Wilson, et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 3014), sistemas de virus vaccinia (Chakrabarty et al., Mol Cell Biol 5: 3403 (1985)) u otros sistemas de suministro de ADN eficientes (Yates et al., Nature 313: 812 (1985)) conocidos por los expertos en la técnica. Estas referencias son solamente ilustrativas y se incorporan a la presente como referencia. Con el fin de suministrar específicamente o transfectar células que están proliferando de manera anormal y evitar las células que no están en división, es preferible utilizar un sistema de suministro de retrovirus, o adenoviral (como se describe en la técnica y en otra parte en la presente memoria) conocidos por los expertos en la técnica. Puesto que se requiere la replicación del ADN del anfitrión para que el ADN retroviral se integre y el retrovirus sea incapaz de auto-replicarse debido a la falta de los genes de retrovirus necesarios para su ciclo de vida, la utilización de semejante sistema de suministro retroviral para los polinucleótidos de la presente invención dirigirá dicho gen y constructos a células que están en proliferación anormalmente y evitará las células normales que no estén en división.

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden suministrar directamente a los sitios de trastorno/enfermedad proliferativos celulares en órganos internos, cavidades corporales y similares mediante el uso de dispositivos de formación de imágenes utilizados para guiar una aguja de inyección directamente al sitio de la enfermedad. Los polinucleótidos de la presente invención también se pueden administrar en sitios de la enfermedad en el momento de una intervención quirúrgica.

Por "enfermedad proliferativa celular" se entiende cualquier enfermedad o trastorno humano o animal, que afecta a uno cualquiera o cualquier combinación de órganos, cavidades, o partes del cuerpo, que se caracteriza por proliferaciones anormales locales únicas o múltiples de células, grupos de células, o tejidos, ya sean benignos o malignos.

Se puede administrar cualquier cantidad de los polinucleótidos de la presente invención con tal que tenga un efecto biológicamente inhibitorio sobre la proliferación de las células tratadas. Además, es posible administrar más de uno de los polinucleótidos de la presente invención simultáneamente al mismo sitio. Por "inhibir biológicamente" se quiere significar la inhibición del crecimiento parcial o total, así como la disminución de la tasa de proliferación o crecimiento de las células. La dosis biológicamente inhibitoria se puede determinar mediante la evaluación de los efectos de los polinucleótidos de la presente invención sobre la neoplasia maligna diana o el crecimiento de células que proliferan anormalmente en un cultivo de tejidos, el crecimiento del tumor en animales y cultivos celulares, o cualquier otro método conocido para un experto ordinario en la técnica.

Por otra parte, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención de la presente invención son útiles en la inhibición de la angiogénesis de las células o tejidos proliferativos, ya sea solos, como una proteína de fusión, o combinados con otro polipéptidos directa o indirectamente, como se describe en la presente memoria. En una realización muy preferida, dicho efecto antiangiogénico se puede lograr indirectamente, por ejemplo, a través de la inhibición de células específicas de tumores, hematopoyéticas, tales como macrófagos asociados al tumor (Véase Joseph IB, et al., J Natl Cancer Inst, 90 (21): 1648-1653 (1998), que se incorpora a la presente como referencia).

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en la inhibición de células o tejidos proliferativos a través de la inducción de la apoptosis. Estas proteínas de fusión y/o polinucleótidos pueden actuar directamente, o indirectamente para inducir la apoptosis de células y tejidos proliferativos, por ejemplo, en la activación de un receptor de dominio muerte, tal como el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF), CD95 (Fas/APO-1), proteína mediadora de apoptosis relacionada con receptor de TNF (TRAMP) y receptor 1 y 2 del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) (Véase Schulze-Osthoff K, et al., Eur J Biochem 254 (3): 439-59 (1998), que se incorpora a la presente como referencia). Por otra parte, en otra realización preferida de la presente invención, estas proteínas de fusión y/o polinucleótidos pueden inducir la apoptosis a través de otros mecanismos, tales como la activación de otras proteínas que activarán la apoptosis, o a través de la estimulación de la expresión de estas proteínas, ya sea solos o combinados con fármacos de molécula pequeña o coadyuvantes, como apoptonina, galectinas, tioredoxinas, proteínas antiinflamatorias (Véanse por ejemplo, Mutat Res 400 (1-2): 447-55 (1998), Med Hypotheses. 50(5): 423-33 (1998), Chem Biol Interact 24 Abr; 111-112: 23-34 (1998), J Mol Med. 76(6): 402-12 (1998), Int J Tissue React; 20(1): 3-15 (1998), que se incorporan todos a la presente como referencia).

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención son útiles en la inhibición de la metástasis de células o tejidos proliferativos. La inhibición se puede producir como resultado directo de la administración de estas proteínas de fusión de albúmina y/o polinucleótidos, o indirectamente, por ejemplo activando la expresión de proteínas conocidas por inhibir la metástasis, por ejemplo alfa 4 integrinas, (Véase, p. ej., Curr Top Microbiol Immunol 1998; 231: 125-41, que se incorpora a la presente como referencia). Semejantes efectos terapéuticos de la presente invención se pueden lograr solos, o combinados con fármacos de molécula pequeña o coadyuvantes.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de suministro de las composiciones que contienen las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención a células diana que expresan el polipéptido unido por, que se une a, o asociado con una proteína fuison albúmina de la invención. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden estar asociadas con polipéptidos heterólogos, ácidos nucleicos heterólogos, toxinas o profármacos a través de interacciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención son útiles en la mejora de la inmunogenicidad y/o antigenicidad de las células o tejidos en proliferación, ya sea directamente, tal como ocurriría si las proteínas de fusión de albúmina de la invención 'vacunaran' la respuesta inmunitaria para responder a antígenos e inmunógenos proliferativos, o indirectamente, como en la activación de la expresión de proteínas conocidas por mejorar la respuesta inmunitaria (p. ej., quimioquinas), a dichos antígenos e inmunógenos.

Trastornos renales

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar trastornos del sistema renal. Los trastornos renales que se pueden diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, insuficiencia renal, nefritis, trastornos de los vasos sanguíneos de los riñones, trastornos renales metabólicos y congénitos, trastornos urinarios del riñón, trastornos autoinmunitarios, esclerosis y necrosis, desequilibrio electrolítico, y cánceres de riñón.

Las enfermedades del riñón que se pueden diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal ateroembólica, enfermedad renal en fase terminal, enfermedades inflamatorias del riñón (p. ej., glomerulonefritis aguda, glomerulonefritis postinfecciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, síndrome nefrótico, glomerulonefritis membranosa, síndrome nefrótico familiar, glomerulonefritis membranoproliferativa I y II, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis crónica, nefritis tubulointersticial aguda, nefritis tubulointersticial crónica, glomerulonefritis post-estreptocócica aguda (GNPE), pielonefritis, nefritis por lupus, nefritis crónica, nefritis intersticial y glomerulonefritis post-estreptocócica), trastornos de los vasos sanguíneos de los riñones (p. ej., infarto de riñón, enfermedad ateroembólica del riñón, necrosis cortical, nefroesclerosis maligna, trombosis de la vena renal, hipoperfusión renal, retinopatía renal, isquemia-reperfusión renal, embolia de la arteria renal y estenosis de la arteria renal), y trastornos renales resultantes de enfermedad del tracto urinario (p. ej., pielonefritis, hidronefrosis, urolitiasis (litiasis renal, nefrolitiasis), nefropatía por reflujo, infecciones del tracto urinario, retención urinaria, y uropatía obstructiva unilateral aguda o crónica).

Además, las composiciones de la invención se pueden utilizar para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar trastornos metabólicos y congénitos del riñón (p. ej., uremia, amiloidosis renal, osteodistrofia renal, acidosis tubular renal, glucosuria renal, diabetes insípida nefrogénica, cistinuria, síndrome de Fanconi, osteosis fibroquística renal (raquitismo renal), enfermedad de Hartnup, síndrome de Bartter, síndrome de Liddle, enfermedad renal poliquística, enfermedad quística medular, riñón en esponja medular, síndrome de Alport, síndrome uña-rótula, síndrome nefrótico congénito, síndrome de aplastamiento, riñón en herradura, nefropatía diabética, diabetes insípida nefrogénica, nefropatía analgésica, cálculos renales y nefropatía membranosa), y trastornos autoinmunitarios del riñón (p. ej., lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Goodpasture, nefropatía por IgA, glomerulonefritis proliferativa mesangial por IgM).

Las composiciones de la invención también se pueden utilizar para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar trastornos escleróticos o necróticos del riñón (p. ej., glomeruloesclerosis, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), glomerulonefritis necrotizante, y necrosis papilar renal), cánceres de riñón (p. ej., nefroma, hipernefroma, nefroblastoma, cáncer de células renales, cáncer de células de transición, adenocarcinoma renal, cáncer de células escamosas y tumor de Wilm), y desequilibrios de electrolitos (p. ej., nefrocalcinosis, piuria, edema, hidronefritis, proteinuria, hiponatremia, hipernatremia, hipopotasemia, hiperpotasemia, hipocalcemia, hipercalcemia, hipofosfatemia e hiperfosfatemia).

Las composiciones de la invención se pueden administrar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, inyección directa con aguja en el sitio de suministro, inyección intravenosa, administración tópica, infusión con catéter, inyectores biolísticos, aceleradores de partículas, depósitos de esponja Gelfoam, otros materiales de depósito disponibles en el mercado, bombas osmóticas, formulaciones farmacéuticas sólidas orales o en supositorios, aplicaciones tópicas o de decantación durante la cirugía, suministro en aerosol.

Tales métodos son conocidos en la técnica. Las composiciones de la invención se pueden administrar como parte de un agente terapéutico, descrito con más detalle a continuación. Los métodos de suministro de polinucleótidos de la invención se describen con más detalle en la presente memoria.

Trastornos cardiovasculares

- 5 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar trastornos cardiovasculares, incluyendo, pero no limitados a, enfermedad de las arterias periféricas, tal como isquemia de las extremidades.
- 10 Los trastornos cardiovasculares incluyen, pero no se limitan a, anomalías cardiovasculares, tales como fístula arterio-arterial, fístula arteriovenosa, malformaciones arteriovenosas cerebrales, defectos congénitos del corazón, atresia pulmonar y Síndrome de la cimitarra. Los defectos cardíacos congénitos incluyen, pero no se limitan a, coartación aórtica, cor triatriatum, anomalías de los vasos coronarios, corazón en Criss cross, dextrocardia, ductus arterioso persistente, anomalía de Ebstein, complejo de Eisenmenger, síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, levocardia, tetralogía de Fallot, transposición de los grandes vasos, doble salida del ventrículo derecho, atresia tricúspide, tronco arterioso persistente y defectos del tabique del corazón, tales como defecto del septo aortopulmonar, defectos del relieve endocárdico, síndrome de Lutembacher, trilogía de Fallot, defectos septales ventriculares del corazón.
- 15 Los trastornos cardiovasculares también incluyen, pero no se limitan a, enfermedades del corazón, tales como arritmias, enfermedad carcinoide cardíaca, gasto cardíaco alto, gasto cardíaco bajo, taponamiento cardíaco, endocarditis (incluyendo bacteriana), aneurisma cardíaco, parada cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía congestiva, disnea paroxística, edema cardíaco, hipertrofia cardíaca, cardiomiopatía congestiva, hipertrofia ventricular izquierda, hipertrofia ventricular derecha, rotura cardíaca después del infarto, ruptura septal ventricular, enfermedades de las válvulas del corazón, enfermedades del miocardio, isquemia de miocardio, derrame pericárdico, pericarditis (incluyendo constrictiva y tuberculosa), neumopericardio, síndrome postpericardiotomía,
- 20 enfermedad cardíaca pulmonar, cardiopatía reumática, disfunción ventricular, hiperemia, complicaciones cardiovasculares del embarazo, síndrome de la Cimitarra, sífilis cardiovascular y tuberculosis cardiovascular.
- 25 Las arritmias incluyen, pero no se limitan a, arritmia sinusal, fibrilación auricular, aleteo auricular, bradicardia, extrasístole, Síndrome de Adams-Stokes, bloqueo de rama, bloqueo sinoauricular, síndrome de QT largo, parasístole, síndrome de Lown-Ganong-Levine, síndrome de preexcitación de tipo Mahaim, síndrome de Wolff-Parkinson-White, síndrome del seno enfermo, taquicardias y fibrilación ventricular. Las taquicardias incluyen taquicardia paroxística, taquicardia supraventricular, ritmo idioventricular acelerado, taquicardia por reentrada nodal atrioventricular, taquicardia auricular ectópica, taquicardia ectópica de la unión, taquicardia por reentrada nodal sinusal, taquicardia sinusal, taquicardia ventricular en entorchado y taquicardia ventricular.
- 30 Las enfermedades de las válvulas cardíacas incluyen, pero no se limitan a, insuficiencia de la válvula aórtica, estenosis de la válvula aórtica, soplos cardíacos, prolapso de la válvula aórtica, prolapso de la válvula mitral, prolapso de la válvula tricúspide, insuficiencia de la válvula mitral, estenosis de la válvula mitral, atresia pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, estenosis de la válvula pulmonar, atresia de la tricúspide, insuficiencia de la válvula tricúspide y estenosis de la válvula tricúspide.
- 35 Las enfermedades miocárdicas incluyen, pero no se limitan a, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía congestiva, cardiomiopatía hipertrófica, estenosis subvalvular aórtica, estenosis subvalvular pulmonar, cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía por Chagas, fibroelastosis endocárdica, fibrosis endomiocárdica, Síndrome de Kearns, lesión por perfusión del miocardio, y miocarditis.
- 40 Las isquemias miocárdicas incluyen, pero no se limitan a, enfermedad coronaria, tal como angina de pecho, aneurisma coronario, arterioesclerosis coronaria, trombosis coronaria, vasoespasmo coronario, infarto de miocardio y disfunción contráctil postisquémica.
- 45 Las enfermedades cardiovasculares también incluyen enfermedades vasculares tales como aneurismas, angiodisplasia, angiomatosis, angiomatosis bacilar, Enfermedad de Hippel-Lindau, Síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber, Síndrome de Sturge-Weber, edema angioneurótico, enfermedades de la aorta, arteritis de Takayasu, aortitis, Síndrome de Leriche, enfermedades oclusivas arteriales, arteritis, enarteritis, poliarteritis nodosa, trastornos cerebrovasculares, angiopatías diabéticas, retinopatía diabética, embolias, trombosis, eritromelalgia, hemorroides, enfermedad veno-oclusiva hepática, hipertensión, hipotensión, isquemia, enfermedades vasculares periféricas, flebitis, enfermedad veno-oclusiva pulmonar, enfermedad de Raynaud, síndrome de CREST, oclusión de la vena retiniana, síndrome de la Cimitarra, síndrome de vena cava superior, telangiectasia, ataxia telangiectasia, telangiectasia hemorrágica hereditaria, varicocele, venas varicosas, úlcera varicosa, vasculitis e insuficiencia venosa.
- 50 Los aneurismas incluyen, pero no se limitan a, aneurismas desecantes, falsos aneurismas, aneurismas infectados, aneurismas rotos, aneurismas aórticos, aneurismas cerebrales, aneurismas coronarios, aneurismas cardíacos y aneurismas ilíacos.
- 55

Las enfermedades oclusivas arteriales incluyen, pero no se limitan a, arteriosclerosis, claudicación intermitente, estenosis de la carótida, displasias fibromusculares, oclusión vascular mesentérica, enfermedad de Moyamoya, obstrucción de la arteria renal, oclusión de la arteria retiniana, y tromboangeitis obliterante.

5 Los trastornos cerebrovasculares incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de la arteria carótida, angiopatía amiloide cerebral, aneurisma cerebral, anoxia cerebral, arterioesclerosis cerebral, malformación arteriovenosa cerebral, enfermedades de la arteria cerebral, embolia y trombosis cerebral, trombosis de la arteria carótida, trombosis del seno, síndrome de Wallenberg, hemorragia cerebral, hematoma epidural, hematoma subdural, hemorragia subaracnoidea, infarto cerebral, isquemia cerebral (incluyendo transitoria), síndrome de robo de la subclavia, leucomalacia periventricular, dolor de cabeza vascular, dolor de cabeza en racimos, migraña e
10 insuficiencia vertebrobasilar.

Las embolias incluyen, pero no se limitan a, embolias de aire, embolias de líquido amniótico, embolias de colesterol, síndrome del dedo del pie azul, embolias de grasa, embolias pulmonares, y tromboembolias. Las trombosis incluyen, pero no se limitan a, trombosis coronaria, trombosis de la vena hepática, oclusión de la vena retiniana, trombosis de la arteria carótida, trombosis del seno, síndrome de Wallenberg y tromboflebitis.

15 Los trastornos isquémicos incluyen, pero no se limitan a, isquemia cerebral, colitis isquémica, síndromes de compartimiento, síndrome del compartimiento anterior, isquemia miocárdica, lesiones de reperfusión e isquemia del miembro periférico. Las vasculitis incluyen, pero no se limitan a, aortitis, arteritis, Síndrome de Behcet, Síndrome de Churg-Strauss, síndrome del ganglio linfático mucocutáneo, tromboangeitis obliterante, vasculitis por hipersensibilidad, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis cutánea alérgica y granulomatosis de Wegener.

20 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden administrar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, inyección directa con aguja en el sitio de suministro, inyección intravenosa, administración tópica, infusión por catéter, inyectores biolísticos, aceleradores de partículas, depósito de esponja de Gelfoam, otros materiales de depósito disponibles en el mercado, bombas osmóticas, formulaciones farmacéuticas sólidas orales o
25 en supositorios, aplicaciones de decantación o tópicos durante la cirugía, suministro en aerosol. Tales métodos son conocidos en la técnica. Los métodos de suministro de polinucleótidos se describen con más detalle en la presente memoria.

Trastornos respiratorios

30 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para tratar, prevenir, diagnosticar, y/o pronosticar las enfermedades y/o trastornos del sistema respiratorio.

Las enfermedades y trastornos del sistema respiratorio incluyen, pero no se limitan a, vestibulitis nasal, rinitis no alérgica (p. ej., rinitis aguda, rinitis crónica, rinitis atrófica, rinitis vasomotora), pólipos nasales, y sinusitis, angiofibromas juveniles, cáncer de la nariz y papilomas juveniles, pólipos de las cuerdas vocales, nódulos (nódulos de cantante), úlceras de contacto, parálisis de las cuerdas vocales, laringoceles, faringitis (p. ej., viral y bacteriana),
35 amigdalitis, celulitis tonsilar, absceso parafaríngeo, laringitis, laringoceles, y cánceres de garganta (p. ej., cáncer de nasofaringe, cáncer de amígdalas, cáncer de laringe), cáncer de pulmón (p. ej., carcinoma de células escamosas, carcinoma de células pequeñas (células de avena), carcinoma de células grandes, y adenocarcinoma), trastornos alérgicos (neumonía eosinófila, neumonitis por hipersensibilidad (p. ej., alveolitis alérgica extrínseca, neumonitis intersticial alérgica, neumoconiosis por polvo orgánico, aspergilosis broncopulmonar alérgica, asma, granulomatosis de Wegener (vasculitis granulomatosa), síndrome de Goodpasture)), neumonía (p. ej., neumonía bacteriana (p. ej., *Streptococcus pneumoniae* (neumonía pneumocócica), *Staphylococcus aureus* (neumonía estafilocócica), neumonía bacteriana Gram-negativa (causada por, p. ej., *Klebsiella* y *Pseudomonas* spp.), neumonía por *Mycoplasma pneumoniae*, neumonía por *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila* (enfermedad del legionario), y
45 *Chlamydia psittaci* (psitacosis)), y neumonía viral (p. ej., gripe, varicela (varicela).

Otras enfermedades y trastornos del sistema respiratorio incluyen, pero no se limitan a bronquiolititis, polio (poliomelitis), croup, infección por virus respiratorio sincitial, paperas, eritema infeccioso (quinta enfermedad), roseola infantum, panencefalitis por rubéola progresiva, sarampión alemán y panencefalitis esclerosante subaguda), neumonía por hongos (p. ej., histoplasmosis, coccidioidomicosis, blastomicosis, infecciones por hongos en personas
50 con sistemas inmunológicos gravemente deprimidos (p. ej., criptococosis, causada por *Cryptococcus neoformans*; aspergilosis, causada por *Aspergillus* spp.; candidiasis, causadas por *Candida*; y mucormicosis)), *Pneumocystis carinii* (neumonía por *Pneumocystis*), neumonías atípicas (por ejemplo, *Mycoplasma* y *Chlamydia* spp.), neumonía oportunista por infección, neumonía nosocomial, neumonitis química, y neumonía por aspiración, trastornos pleurales (p. ej., pleuresía, derrame pleural, y neumotórax (p. ej., neumotórax espontáneo simple, neumotórax espontáneo complicado, neumotórax por tensión)), enfermedades obstructivas de las vías respiratorias (p. ej., asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema, bronquitis crónica o aguda), enfermedades laborales de los pulmones (p. ej., silicosis, pulmón negro (neumoconiosis de los mineros del carbón), asbestosis, beriliosis, asma ocupacional, bisinosis, y neumoconiosis benigna), enfermedad pulmonar infiltrativa (p. ej., fibrosis pulmonar (p. ej., alveolitis fibrosante, neumonía intersticial usual), fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial descamativa,

neumonía intersticial linfóide, histiocitosis X (p. ej., enfermedad de Letterer-Siwe, enfermedad Hand-Schüller-Christian, granuloma eosinófilo), hemosisiderosis pulmonar idiopática, sarcoidosis y proteinosis alveolar pulmonar), síndrome de dificultad respiratoria aguda (también llamado, p. ej., síndrome de distrés respiratorio), edema, embolia pulmonar, bronquitis (p. ej., bacteriana viral), bronquiectasia, atelectasia, abscesos del pulmón (causados, p. ej., *Staphylococcus aureus* o *Legionella pneumophila*), y fibrosis quística.

Actividad anti-angiogénesis

El equilibrio natural entre estimuladores e inhibidores endógenos de la angiogénesis es uno de equilibrio en el que predominan las influencias inhibitorias. Rastinejad et al., Cell 56: 345- 355 (1989). En aquellos raros casos en los que la neovascularización ocurre bajo condiciones fisiológicas normales, tales como la curación de heridas, la regeneración de órganos, el desarrollo embrionario, y los procesos reproductivos femeninos, la angiogénesis está estrictamente regulada y espacial y temporalmente delimitada. En condiciones de angiogénesis patológica, tales como las que caracterizan el crecimiento de los tumores sólidos, estos controles reguladores fallan. La angiogénesis no regulada se convierte en patológica y mantiene la progresión de muchas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. Numerosas enfermedades graves están dominadas por una neovascularización anormal incluyendo el crecimiento y la metástasis de tumores sólidos, la artritis, algunos tipos de trastornos oculares, y la psoriasis. Véanse, p. ej., las revisiones de Moses et al., Biotech. 9: 630-634 (1991); Folkman et al., N. Engl. J. Med., 333: 1757-1763 (1995); Auerbach et al., J. Microvasc. Res. 29: 401-411 (1985); Folkman, Advances in Cancer Research, eds. Klein y Weinhouse, Academic Press, Nueva York, págs. 175-203 (1985); Patz, Am. J. Ophthalmol. 94: 715-743 (1982); y Folkman et al., Science 227: 719-725 (1983). En numerosas afecciones patológicas, el proceso de angiogénesis contribuye al estado de enfermedad. Por ejemplo, se han acumulado datos significativos que sugieren que el crecimiento de tumores sólidos depende de la angiogénesis. Folkman y Klagsbrun, Science 255: 442-447 (1987).

La presente invención proporciona el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la neovascularización mediante la administración de proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Las afecciones malignas y metastásicas que se pueden tratar con los polinucleótidos y polipéptidos, o agonistas o antagonistas de la invención incluyen, pero no se limitan a, tumores malignos, tumores sólidos y cánceres descritos en este documento y conocidos de otra manera en la técnica (para una revisión de tales trastornos, véase Fishman et al., Medicina, 2ª ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia (1985)). Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad y/o trastorno relacionado con la angiogénesis, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención. Por ejemplo, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar en una variedad de métodos adicionales con el fin de tratar terapéuticamente un cáncer o tumor. Los cánceres que se pueden tratar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a tumores sólidos, incluyendo cáncer de próstata, pulmón, mama, ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículo, hígado, parótida, tracto biliar, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, riñón, vejiga, tiroides; tumores primarios y metástasis; melanomas; glioblastoma; Sarcoma de Kaposi; leiomiomas; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer colorrectal; neoplasias malignas avanzadas; y tumores presentes en la sangre tales como leucemias. Por ejemplo, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden suministrar por vía tópica, con el fin de tratar cánceres tales como cáncer de piel, tumores de cabeza y cuello, tumores de mama, y sarcoma de Kaposi.

En otros aspectos adicionales, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para tratar formas superficiales de cáncer de vejiga mediante, por ejemplo, administración intravesical. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser suministrados directamente en el tumor, o cerca del sitio del tumor, a través de una inyección o un catéter. Por supuesto, como apreciará el experto en la técnica, el modo apropiado de administración variará según el cáncer a tratar. Otros modos de administración se comentan en la presente memoria.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de otros trastornos, además de cánceres, que implican angiogénesis. Estos trastornos incluyen, pero no se limitan a: tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas, y granulomas piógenos; placas arterioescleróticas; enfermedades oculares angiogénicas, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis, retinoblastoma, uveítis y pterigión (crecimiento anormal de los vasos sanguíneos) del ojo; artritis reumatoide; psoriasis; retraso en la cicatrización de heridas; endometriosis; vasculogénesis; granulaciones; cicatrices hipertróficas (queloides); fracturas sin unión; esclerodermia; tracoma; adherencias vasculares; angiogénesis miocárdica; colaterales coronarias; colaterales cerebrales; malformaciones arteriovenosas; angiogénesis de extremidades isquémicas; Síndrome de Osler-Webber; neovascularización de la placa; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; displasia fibromuscular; granulación de heridas; Enfermedad de Crohn; y aterosclerosis.

Por ejemplo, dentro de un aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides, que comprenden la etapa de administrar proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención a una cicatriz hipertrófica o queloide.

En una realización de la presente invención, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se inyectan directamente en una cicatriz hipertrófica o queloide, con el fin de prevenir la progresión de estas lesiones. Esta terapia tiene un especial valor en el tratamiento profiláctico de afecciones que se sabe que dan como resultado el desarrollo de cicatrices hipertróficas y queloides (p. ej., quemaduras), y se inicia preferiblemente después de que la fase proliferativa haya tenido tiempo para progresar (aproximadamente 14 días después de la lesión inicial), pero antes del desarrollo de la cicatriz hipertrófica o queloide. Como se ha señalado anteriormente, la presente invención también proporciona métodos para tratar enfermedades neovasculares del ojo, incluyendo por ejemplo, neovascularización de la córnea, glaucoma neovascular, retinopatía diabética proliferativa, fibroplasia retrolental y degeneración macular.

Además, los trastornos oculares asociados con la neovascularización que se pueden tratar con las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a: glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinoblastoma, fibroplasia retrolental, uveítis, retinopatía del prematuro, degeneración macular, neovascularización de injerto corneal, así como otras enfermedades inflamatorias del ojo, tumores oculares y enfermedades asociadas con la coroides o neovascularización del iris. Véanse, p. ej., las revisiones Waltman et al., *Am. J. Ophthalmol.* 85: 704-710 (1978) y Gartner et al., *Surv. Ophthalmol.* 22: 291- 312 (1978).

Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención se proporcionan métodos para el tratamiento de enfermedades neovasculares del ojo, tales como neovascularización corneal (incluyendo neovascularización del injerto corneal), que comprenden la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto (p. ej., proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención) a la córnea, de manera que la formación de vasos sanguíneos sea inhibida. En pocas palabras, la córnea es un tejido que normalmente carece de vasos sanguíneos. En ciertas condiciones patológicas, sin embargo, los capilares pueden extenderse a la córnea desde el plexo vascular pericorneal del limbo. Cuando la córnea se vasculariza, también se enturbia, dando lugar a una disminución de la agudeza visual del paciente. La pérdida visual puede llegar a ser completa si la córnea se opacifica por completo. Una amplia variedad de trastornos pueden dar lugar a la neovascularización corneal, incluyendo, por ejemplo, infecciones de la córnea (p. ej., tracoma, queratitis por herpes simple, leishmaniasis y oncocerciasis), procesos inmunológicos (por ejemplo, rechazo de injerto y síndrome de Stevens-Johnson), quemaduras alcalinas, trauma, inflamación (de cualquier causa), estados de deficiencia nutricional y tóxicos, y como complicación del uso de lentes de contacto.

En realizaciones particularmente preferidas de la invención, se pueden preparar para la administración tópica en solución salina (combinados con cualquiera de los conservantes y agentes antimicrobianos utilizados comúnmente en preparaciones oculares), y administrar en forma de colirio. La solución o suspensión se puede preparar en su forma pura y administrar varias veces al día. Alternativamente, las composiciones anti-angiogénicas, preparadas como se ha descrito anteriormente, se pueden administrar también directamente a la córnea. En realizaciones preferidas, la composición anti-angiogénica se prepara con un polímero mucoadhesivo que se une a la córnea. En realizaciones adicionales, los factores anti-angiogénicos o las composiciones anti-angiogénicas se pueden utilizar como un complemento a la terapia convencional con esteroides. La terapia tópica puede ser útil también profilácticamente en lesiones de la córnea que se sabe que tienen una alta probabilidad de inducir una respuesta angiogénica (tales como quemaduras químicas). En estos casos el tratamiento, probablemente combinado con esteroides, se puede instituir inmediatamente para ayudar a prevenir las posteriores complicaciones.

En otras realizaciones, los compuestos descritos anteriormente pueden ser inyectados directamente en el estroma corneal por un oftalmólogo con la ayuda de un microscopio. El sitio preferido de inyección puede variar con la morfología de la lesión individual, pero el objetivo de la administración sería colocar la composición en el frente de avance de la vasculatura (es decir, intercalado entre los vasos sanguíneos y la córnea normal). En la mayoría de los casos esto implicaría una inyección corneal perilímbica para "proteger" la córnea de los vasos sanguíneos que avanzan. Este método también se puede utilizar poco después de un insulto corneal con el fin de prevenir profilácticamente la neovascularización corneal. En esta situación el material podría inyectarse en la córnea perilímbica intercalado entre la lesión corneal y su suministro potencial de sangre límbica no deseado. Tales métodos también se pueden utilizar de una manera similar para evitar la invasión capilar de las córneas trasplantadas. En una forma de liberación sostenida, las inyecciones solamente podrían ser necesarias 2-3 veces por año. También se podría añadir un esteroide a la solución de inyección para reducir la inflamación resultante de la propia inyección.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para tratar el glaucoma neovascular, que comprenden la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención al ojo, de tal manera que se inhibe la formación de vasos sanguíneos. En una realización, el compuesto se puede administrar tópicamente al ojo con el fin de tratar las formas tempranas de glaucoma neovascular. En otras

realizaciones, el compuesto se puede implantar mediante inyección en la región del ángulo de la cámara anterior. En otras realizaciones, el compuesto también se puede colocar en cualquier ubicación de manera que el compuesto se libera continuamente en el humor acuoso. En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para tratar la retinopatía diabética proliferativa, que comprenden la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención a los ojos, de manera que se inhibe la formación de vasos sanguíneos.

En realizaciones particularmente preferidas de la invención, la retinopatía diabética proliferativa se puede tratar por inyección en el humor acuoso o el vítreo, con el fin de aumentar la concentración local del polinucleótido, polipéptido, antagonista y/o agonista en la retina. Preferiblemente, este tratamiento debe iniciarse antes de contraer una enfermedad grave que requiera fotocoagulación.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para tratar la fibroplasia retrolental, que comprenden la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención al ojo, de tal manera que se inhiba la formación de vasos sanguíneos. El compuesto se puede administrar por vía tópica, mediante inyección intravítrea y/o mediante implantes intraoculares.

Además, los trastornos que se pueden tratar con proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, hemangioma, artritis, psoriasis, angiofibroma, placas ateroscleróticas, curación de heridas retardada, granulaciones, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, fracturas sin unión, síndrome Osler-Weber, granuloma piógeno, esclerodermia, tracoma y adherencias vasculares.

Por otra parte, los trastornos y/o estados, que se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar con las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos, tumores de origen sanguíneo tales como leucemias, metástasis tumorales, sarcoma de Kaposi, tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas, y granulomas piógenos, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis, retinoblastoma, y uveítis, retraso en la cicatrización de heridas, endometriosis, vasculogénesis, granulaciones, cicatrices hipertróficas (queloides), fracturas sin unión, esclerodermia, tracoma, adherencias vasculares, angiogénesis miocárdica, colaterales coronarias, colaterales cerebrales, malformaciones arteriovenosas, angiogénesis del miembro isquémico, síndrome de Osler-Webber, neovascularización de placa, telangiectasia, articulaciones hemofílicas, angiofibroma, displasia fibromuscular, granulación de heridas, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, agente de control de la natalidad al impedir la vascularización requerida para la implantación del embrión controlando la menstruación, enfermedades que presentan angiogénesis como consecuencia patológica tal como la enfermedad por arañazo de gato (Rochele minalia quintosa), úlceras (*Helicobacter pylori*), Bartonelosis y angiomatosis bacilar.

En un aspecto del método de control de natalidad, se administra una cantidad del compuesto suficiente para bloquear la implantación del embrión antes o después de que se hayan producido el coito y la fertilización, lo que proporciona un método efectivo de control de la natalidad, posiblemente un método del "día después". Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden utilizar en el control de la menstruación o administrarse ya sea como un líquido de lavado peritoneal o para implantación peritoneal en el tratamiento de endometriosis.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden incorporar a suturas quirúrgicas con el fin de prevenir granulomas por las puntadas.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser utilizados en una amplia variedad de procedimientos quirúrgicos. Por ejemplo, en un aspecto de la presente invención se puede utilizar una composición (en forma de, por ejemplo, una pulverización o película) para recubrir o pulverizar un área antes de la extirpación de un tumor, con el fin de aislar los tejidos normales circundantes del tejido maligno, y/o para prevenir la propagación de la enfermedad a los tejidos circundantes. En otros aspectos de la presente invención, las composiciones (p. ej., en forma de una pulverización) se pueden administrar mediante procedimientos endoscópicos con el fin de recubrir tumores, o inhibir la angiogénesis en un entorno local deseado. En otros aspectos adicionales de la presente invención, se pueden utilizar mallas quirúrgicas que se han recubierto con composiciones anti-angiogénicas de la presente invención en cualquier procedimiento en el que se pueda utilizar una malla quirúrgica. Por ejemplo, en una realización de la invención, se puede utilizar una malla quirúrgica cargada con una composición anti-angiogénica durante la cirugía de resección de cáncer abdominal (p. ej., posterior a la resección de colon) con el fin de proporcionar apoyo a la estructura, y para liberar una cantidad del factor anti-angiogénico.

En otros aspectos de la presente invención, se proporcionan métodos para tratar sitios de extirpación de tumores, que comprenden administrar las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención a los márgenes de resección de un tumor después de la extirpación, de manera que se inhiba la recurrencia local del cáncer y la formación de nuevos vasos sanguíneos en el sitio. En una realización de la invención, el compuesto anti-angiogénico se administra directamente al sitio de escisión del tumor (p. ej., aplicado mediante hisopo, cepillo o recubriendo de otro modo los bordes de resección del tumor con el compuesto anti-angiogénico). Alternativamente, los compuestos anti-angiogénicos se pueden incorporar a pastas quirúrgicas conocidas antes de la administración. En realizaciones particularmente preferidas de la invención, los compuestos anti-angiogénicos se aplican después de las resecciones hepáticas de neoplasias malignas, y después de operaciones neuroquirúrgicas.

En un aspecto de la presente invención, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden administrar al margen de resección de una amplia variedad de tumores, incluyendo, por ejemplo, de mama, de colon, de cerebro y hepáticos. Por ejemplo, en una realización de la invención, los compuestos anti-angiogénicos se pueden administrar al sitio de un tumor neurológico después de la extirpación, de tal manera que se inhiba la formación de nuevos vasos sanguíneos en el sitio.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden administrar junto con otros factores anti-angiogénicos. Los ejemplos representativos de otros factores anti-angiogénicos incluyen: Factor Anti-Invasivo, ácido retinoico y derivados del mismo, paclitaxel, Suramin, inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1, inhibidor tisular de la metaloproteinasa-2, inhibidor del activador del plasminógeno 1, inhibidor del activador del plasminógeno 2 y diversas formas de los metales de transición más ligeros del "grupo d".

Los metales de transición más ligeros del "grupo d" incluyen, por ejemplo, especies de vanadio, molibdeno, tungsteno, titanio, niobio, y tántalo. Estas especies de metales de transición pueden formar complejos de metales de transición. Los complejos adecuados de las especies de metales de transición mencionadas anteriormente incluyen oxocomplejos de metales de transición.

Los ejemplos representativos de complejos de vanadio incluyen oxocomplejos de vanadio tales como complejos de vanadato y vanadilo. Los complejos de vanadato adecuados incluyen complejos de metavanadato y ortovanadato tales como, por ejemplo, metavanadato de amonio, metavanadato sódico y ortovanadato sódico. Los complejos de vanadilo adecuados incluyen, por ejemplo, acetilacetato de vanadilo y sulfato de vanadilo, incluyendo hidratos de sulfato de vanadilo, tales como mono- y tri-hidratos de sulfato de vanadilo.

Los ejemplos representativos de complejos de tungsteno y molibdeno también incluyen oxocomplejos. Los oxocomplejos de tungsteno adecuados incluyen oxocomplejos de óxido de tungstato y tungsteno. Los complejos de tungstato adecuados incluyen tungstato de amonio, tungstato de calcio, dihidrato de tungstato sódico y ácido túngstico. Los óxidos de tungsteno adecuados incluyen óxido de tungsteno (IV) y óxido de tungsteno (VI). Los oxocomplejos de molibdeno adecuados incluyen molibdato, óxido de molibdeno y complejos de molibdenilo. Los complejos de molibdato adecuados incluyen molibdato amónico y sus hidratos, molibdato sódico y sus hidratos, y molibdato de potasio y sus hidratos. Los óxidos de molibdeno adecuados incluyen óxido de molibdeno (VI), óxido de molibdeno (VI) y ácido molibdico. Los complejos de molibdenilo adecuados incluyen, por ejemplo, acetilacetato de molibdenilo. Otros complejos de tungsteno y molibdeno adecuados incluyen derivados hidroxilo que derivan, por ejemplo, de glicerol, ácido tartárico, y azúcares.

Se puede utilizar una amplia variedad de otros factores anti-angiogénicos en el contexto de la presente invención. Los ejemplos representativos incluyen factor plaquetario 4; sulfato de protamina; derivados de quitina sulfatados (preparados a partir de conchas de cangrejo reina), (Murata et al., Cancer Res 51: 22-26, 1991); complejos de polisacárido sulfatado-peptidoglicano (SP-PG) (la función de este compuesto puede ser mejorada por la presencia de esteroides tales como estrógeno y citrato de tamoxifeno); estaurosporina; moduladores del metabolismo de la matriz, incluyendo por ejemplo, análogos de prolina, cishidroxiprolina, d,L-3,4-deshidroprolina, tiaprolina, alfa,alfa-dipiridilo, fumarato de aminopropionitrilo; 4-propil-5-(4-piridinil)-2(3H)-oxazolona; metotrexato; mitoxantrona; heparina; interferones; 2 macroglobulina de suero; ChIMP-3 (Pavloff et al., J. Bio Chem. 267: 17321-17326, (1992)); Quimostatina (Tomkinson et al., Biochem J. 286: 475-480, (1992).); ciclodextrina tetradecasulfato; eponemicina; camptotecina; fumagilina (Ingber et al., Nature 348: 555-557, 1990); tiomalato de oro y sodio ("GST"; Matsubara y Ziff, J. Clin Invest 79: 1440-1446, (1987)); anticollagenasa de suero; alfa2-antiplasmina (Holmes et al., J. Biol Chem 262 (4): 1659-1664, (1987)); bisantreno (Instituto Nacional del Cáncer); Lobenzarit disódico (ácido N-(2)- carboxifenil-4-cloroantranílico disódico o "CCA"; Takeuchi et al., Agents Actions 36: 312-316, (1992)); talidomida; esteroides angiostáticos; AGM-1470; carboxinaminoimidazol; e inhibidores de metaloproteinasas tales como BB94.

Enfermedades a nivel celular

Las enfermedades asociadas con el aumento de la supervivencia celular o la inhibición de la apoptosis que se podrían tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar utilizando proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen cánceres (tales como linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53 y tumores dependientes de hormonas, incluyendo, pero no limitados a cáncer de

colon, tumores cardíacos, cáncer pancreático, melanoma, retinoblastoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer intestinal, cáncer testicular, cáncer de estómago, neuroblastoma, mixoma, mioma, linfoma, endotelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteosarcoma, condrosarcoma, adenoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, sarcoma de Kaposi y cáncer de ovario); trastornos autoinmunitarios (tales como, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis relacionada con el sistema inmunitario y artritis reumatoide) e infecciones virales (tales como virus del herpes, virus de la viruela y adenovirus), inflamación, enfermedad de injerto v. anfitrión, rechazo agudo del injerto, y rechazo crónico del injerto.

En realizaciones preferidas, se utilizan las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención para inhibir el crecimiento, la progresión, y/o la metástasis de cánceres, en particular los mencionados anteriormente.

Otras enfermedades o afecciones asociadas con el aumento de la supervivencia celular que se podrían tratar o detectar mediante las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, la progresión, y/o la metástasis de neoplasias malignas y trastornos relacionados tales como leucemia (incluyendo leucemias agudas (p. ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda (incluyendo mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (p. ej., leucemia mieloide crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, y tumores sólidos, incluyendo, pero no limitados a, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello de útero, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma.

Las enfermedades asociadas con un aumento de la apoptosis que se podrían tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar utilizando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero no se limitan a, SIDA; trastornos neurodegenerativos (tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelar y tumor cerebral o enfermedad asociada con priones); trastornos autoinmunitarios (tales como, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis relacionada con el sistema inmunitario y artritis reumatoide) síndromes mielodisplásicos (tales como anemia aplásica), enfermedad de injerto v. anfitrión, lesión isquémica (tal como la causada por infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y lesión por reperfusión), lesión de hígado (p. ej., lesión hepática relacionada con hepatitis, lesión por isquemia/reperfusión, colestosis (lesión de los conductos biliares) y cáncer de hígado); enfermedad del hígado inducida por toxinas (tal como la causada por el alcohol), choque séptico, caquexia y anorexia.

Curación de heridas y proliferación de células epiteliales

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la utilización de proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, con fines terapéuticos, por ejemplo, para estimular la proliferación de células epiteliales y queratinocitos basales con el fin de cicatrizar heridas, y para estimular la producción de folículos pilosos y cicatrización de heridas dérmicas. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, pueden ser clínicamente útiles en la estimulación de la curación de heridas incluyendo heridas quirúrgicas, heridas por escisión, heridas profundas que implican daños de la dermis y epidermis, heridas del tejido ocular, heridas del tejido dental, heridas de la cavidad oral, úlceras diabéticas, úlceras dérmicas, úlceras de decúbito, úlceras arteriales, úlceras por estasis venosa, quemaduras que resultan de la exposición al calor o productos químicos, y otras afecciones de curación de heridas anormales tales como uremia, malnutrición, deficiencias de vitaminas y complicaciones asociadas con el tratamiento sistémico con esteroides, radioterapia y medicamentos antineoplásicos y antimetabolitos. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se podrían utilizar para promover el restablecimiento dérmico posterior a la pérdida dérmica.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se podrían utilizar para aumentar la adherencia de injertos de piel a un lecho de la herida y estimular la reepitelización del lecho de la herida. Los siguientes son tipos de injertos en los que las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención,

podrían ser utilizados para aumentar la adherencia al lecho de la herida: autoinjertos, piel artificial, aloinjertos, injertos autodérmicos, injertos autoepidérmicos, injertos avasculares, injertos de Blair-Brown, injertos óseos, injertos brefoblásticos, injerto de cutis, injertos retardados, injerto dérmico, injerto epidérmico, injerto de fascia, injerto de espesor total, injerto heterólogo, xenoinjerto, injerto homólogo, injerto hiperplásico, injerto lamelar, injerto de malla, injerto de mucosa, Ollier-Thiersch, injerto omenpal, injerto de parche, injerto pediculado, injerto penetrante, injerto laminar de piel, injerto de todas las capas de piel. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para promover la fuerza de la piel y para mejorar el aspecto de la piel envejecida.

Se cree que las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, también producirán cambios en la proliferación de hepatocitos, y la proliferación de células epiteliales en el pulmón, mama, páncreas, estómago, intestino delgado, e intestino grueso. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, podrían promover la proliferación de células epiteliales tales como sebocitos, folículos pilosos, hepatocitos, neumocitos de tipo II, células caliciformes productoras de mucina, y otras células epiteliales y sus progenitoras contenidas en la piel, pulmón, hígado y tracto gastrointestinal. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, pueden promover la proliferación de células endoteliales, queratinocitos, y queratinocitos basales.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, también se podrían utilizar para reducir los efectos secundarios de la toxicidad intestinal que resulta de los tratamientos de radiación, quimioterapia o infecciones virales. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, pueden tener un efecto citoprotector sobre la mucosa del intestino delgado. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, también pueden estimular la curación de mucositis (úlceras en la boca) que resultan de la quimioterapia e infecciones virales.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se podrían utilizar adicionalmente en la regeneración de la piel en defectos en el grosor parcial o completo de la piel, incluyendo quemaduras (es decir, repoblación de folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas), tratamiento de otras defectos de la piel como la psoriasis. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, podrían utilizarse para tratar la epidermolisis bullosa, un defecto en la adherencia de la epidermis a la dermis subyacente que da lugar a ampollas frecuentes, abiertas y dolorosas acelerando la reepitelización de estas lesiones. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, también se podrían utilizar para tratar úlceras gástricas y duodenales y ayudar a curar mediante la formación de cicatrices del revestimiento de la mucosa y la regeneración de la mucosa glandular y el revestimiento de la mucosa duodenal más rápidamente. Las enfermedades inflamatorias del intestino, tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, son enfermedades que dan lugar a la destrucción de la superficie mucosa del intestino delgado o grueso, respectivamente. Así, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se podrían utilizar para promover el rejuvenecimiento de la superficie mucosa para ayudar a una curación más rápida y a prevenir la progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal. Se espera que el tratamiento con proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención tenga un efecto significativo en la producción de moco en todo el tracto gastrointestinal y se podría utilizar para proteger la mucosa intestinal de sustancias nocivas que se ingieren o después de la cirugía. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se podrían utilizar para el tratamiento de enfermedades que se asocian con una reducción de la expresión.

Por otra parte, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, podrían ser utilizados para prevenir y curar el daño en los pulmones debido a diversos estados patológicos. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, podrían estimular la proliferación y diferenciación y promover la reparación del epitelio de los alvéolos y bronquiolar para prevenir o tratar el daño pulmonar agudo o crónico. Por ejemplo, el enfisema, que da lugar a la pérdida progresiva de alvéolos, y las lesiones por inhalación, es decir, resultantes de la inhalación de humo y quemaduras, que causan necrosis del epitelio bronquiolar y los alvéolos pueden ser tratados eficazmente utilizando los polinucleótidos o polipéptidos, agonistas o antagonistas de la presente invención. También las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, podrían utilizarse para estimular la proliferación y diferenciación de neumocitos de tipo II, que pueden ayudar a tratar o prevenir enfermedades tales como las enfermedades de la membrana hialina, tales como el síndrome de dificultad respiratoria infantil y la displasia broncopulmonar, en los bebés prematuros.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, podrían estimular la proliferación y diferenciación de hepatocitos y, por lo tanto, se podrían utilizar para aliviar o tratar enfermedades y patologías del hígado tales como la insuficiencia hepática fulminante

causada por cirrosis, daño hepático causado por hepatitis viral y sustancias tóxicas (es decir, acetaminofeno, tetracloruro de carbono y otras hepatotoxinas conocidas en la técnica).

Además, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se podrían utilizar para tratar o prevenir la aparición de la diabetes mellitus. En pacientes con diabetes Tipos I y II recién diagnosticada, en los que queda alguna función de las células de los islotes, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se podrían utilizar para mantener la función de los islotes con el fin de aliviar, retrasar o prevenir la manifestación permanente de la enfermedad. Asimismo, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se podrían utilizar como un coadyuvante en el trasplante de células de los islotes para mejorar o promover la función de las células de los islotes.

Actividad neuronal y enfermedades neurológicas

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades, trastornos, daños o lesiones del cerebro y/o sistema nervioso. Los trastornos del sistema nervioso que se pueden tratar con las composiciones de la invención (p. ej., proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención) incluyen, pero no se limitan a, lesiones del sistema nervioso, y enfermedades o trastornos que dan como resultado una desconexión de axones, una disminución o degeneración de neuronas, o una desmielinización. Las lesiones del sistema nervioso que se pueden tratar en un paciente (incluyendo pacientes mamíferos humanos y no humanos) de acuerdo con los métodos de la invención, incluyen pero no se limitan a, las siguientes lesiones de los sistemas nerviosos central (incluyendo médula espinal, cerebro) o periférico: (1) lesiones isquémicas, en las que una carencia de oxígeno en una parte del sistema nervioso da como resultado lesión o muerte neuronal, incluyendo infarto cerebral o isquemia, o infarto de la médula espinal o isquemia; (2) lesiones traumáticas, incluyendo lesiones causadas por lesión física o asociadas con cirugía, por ejemplo, lesiones que seccionan una porción del sistema nervioso, o lesiones por compresión; (3) lesiones malignas, en las que una porción del sistema nervioso es destruida o lesionada por tejido maligno que es una neoplasia maligna asociada al sistema nervioso o una neoplasia maligna derivada de tejido que no es del sistema nervioso; (4) lesiones infecciosas, en las que una parte del sistema nervioso se destruye o lesiona como resultado de la infección, por ejemplo, por un absceso o asociada con una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, herpes zoster, o virus del herpes simple o con la enfermedad de Lyme, la tuberculosis o la sífilis; (5) lesiones degenerativas, en las que una parte del sistema nervioso se destruye o lesiona como resultado de un proceso degenerativo que incluye, pero no se limita a, la degeneración asociada con la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, el corea de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA); (6) lesiones asociadas con enfermedades o trastornos nutricionales, en los que una parte del sistema nervioso se destruye o lesiona por un trastorno nutricional o un trastorno del metabolismo incluyendo, pero no limitado a, la deficiencia de vitamina B12, deficiencia de ácido fólico, enfermedad de Wernicke, ambliopía por tabaco-alcohol, enfermedad de Marchiafava-Bignami (degeneración primaria del cuerpo calloso) y degeneración cerebelosa alcohólica; (7) lesiones neurológicas asociadas con enfermedades sistémicas, incluyendo, pero no limitadas a, diabetes (neuropatía diabética, parálisis de Bell), lupus eritematoso sistémico, carcinoma, o sarcoidosis; (8) lesiones causadas por sustancias tóxicas, incluyendo alcohol, plomo o neurotoxinas concretas; y (9) lesiones desmielinizantes en las que una parte del sistema nervioso se destruye o lesiona por una enfermedad desmielinizante, incluyendo, pero no limitadas a, esclerosis múltiple, inmunodeficiencia mielopatía asociada al virus de la inmunodeficiencia humana, mielopatía transversa o diversas etiologías, leucoencefalopatía multifocal progresiva, y mielínolisis pontina central.

En una realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para proteger las células neurales de los efectos dañinos de la hipoxia. En una realización preferida adicional, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para proteger las células neurales de los efectos dañinos de la hipoxia cerebral. De acuerdo con esta realización, las composiciones de la invención se utilizan para tratar o prevenir la lesión de las células neurales asociada con la hipoxia cerebral. En un aspecto no exclusivo de esta realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se utilizan para tratar o prevenir la lesión de las células neuronales asociada con la isquemia cerebral. En otro aspecto no exclusivo de esta realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para tratar o prevenir la lesión de las células neurales asociada con el infarto cerebral.

En otra realización preferida, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para tratar o prevenir la lesión de las células neurales asociada con un accidente cerebrovascular. En una realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para tratar o prevenir la lesión de las células neuronales cerebrales asociada con un accidente cerebrovascular.

En otra realización preferida, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para tratar o prevenir la lesión de las células neurales asociada con un ataque al corazón. En una realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para

tratar o prevenir la lesión de las células neuronales cerebrales asociada con un ataque al corazón.

Las composiciones de la invención que son útiles para tratar o prevenir un trastorno del sistema nervioso se pueden seleccionar sometiendo a ensayo la actividad biológica en la promoción de la supervivencia o diferenciación de neuronas. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las composiciones de la invención que provocan cualquiera de los siguientes efectos pueden ser útiles de acuerdo con la invención: (1) aumento del tiempo de supervivencia de las neuronas en cultivo, ya sea en presencia o ausencia de hipoxia o condiciones de hipoxia; (2) aumento de la germinación de las neuronas en cultivo o *in vivo*; (3) aumento de la producción de una molécula asociada con neuronas en cultivo o *in vivo*, p. ej., acetilcolintransferasa o acetilcolinesterasa con respecto a las neuronas motoras; o (4) disminución de los síntomas de disfunción neuronal *in vivo*. Tales efectos se pueden medir por cualquier método conocido en la técnica. En realizaciones no limitantes preferidas, el aumento de la supervivencia de las neuronas se puede medir rutinariamente utilizando un método expuesto en la presente memoria o conocido de otra manera en la técnica, tal como, por ejemplo, Zhang et al., en Proc Natl Acad Sci USA 97:3637-42 (2000) o por Arakawa et al., en J. Neurosci, 70: 3507-15 (1990); el aumento de la proliferación de neuronas se puede detectar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, los métodos expuestos por Pestronk et al., en Exp. Neurol, 70: 65-82 (1980), o Brown et al., en Ann. Rev. Neurosci, 4: 11-42 (1981); el aumento de la producción de moléculas asociadas con neuronas se puede medir por medio de bioanálisis, análisis enzimático, unión de anticuerpos, análisis de transferencia Northern, etc., utilizando mecanismos conocidos en la técnica y en función de la molécula que se vaya a medir; y la disfunción de las neuronas motoras se puede medir evaluando la manifestación física del trastorno de neuronas motoras, p. ej., debilidad, velocidad de conducción de las neuronas motoras, o discapacidad funcional.

En realizaciones específicas, los trastornos de las neuronas motoras que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, trastornos tales como infarto, infección, exposición a toxinas, trauma, daño quirúrgico, enfermedad degenerativa o neoplasia maligna que pueden afectar a las neuronas motoras, así como otros componentes del sistema nervioso, así como trastornos que afectan selectivamente a las neuronas, tales como la esclerosis lateral amiotrófica, y que incluyen, pero no se limitan a, atrofia muscular espinal progresiva, parálisis bulbar progresiva, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular infantil y juvenil, parálisis bulbar progresiva de la infancia (síndrome de Fazio-Londe), poliomielitis y el síndrome postpolio, y la neuropatía motosensorial hereditaria (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth).

Además, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden jugar un papel en la supervivencia neuronal; la formación de sinapsis; la conductancia; la diferenciación neural, etc. Por lo tanto, las composiciones de la invención (incluyendo las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención) se pueden utilizar para diagnosticar y/o tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados con estos papeles, incluyendo, pero no limitados a, los trastornos del aprendizaje y/o la cognición. Las composiciones de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de estados de enfermedad neurodegenerativos y/o trastornos del comportamiento. Tales estados de enfermedad neurodegenerativos y/o trastornos del comportamiento incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, esquizofrenia, manía, demencia, paranoia, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de pánico, discapacidades de aprendizaje, ELA, psicosis, autismo, y comportamientos alterados, incluyendo trastornos en la alimentación, los patrones de sueño, el equilibrio y la percepción. Además, las composiciones de la invención también pueden jugar un papel en el tratamiento, prevención y/o detección de trastornos del desarrollo asociados con el desarrollo del embrión, o trastornos ligados al sexo.

Adicionalmente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, pueden ser útiles en la protección de células neuronales de enfermedades, daños, trastornos o lesiones, asociados con trastornos cerebrovasculares, incluyendo, pero no limitados a, enfermedades de la arteria carótida (p. ej., trombosis de la arteria carótida, estenosis de la carótida, o enfermedad de Moyamoya), angiopatía amiloide cerebral, aneurisma cerebral, anoxia cerebral, arterioesclerosis cerebral, malformaciones arteriovenosas cerebrales, enfermedades de la arteria cerebral, embolia cerebral y trombosis (p. ej., trombosis de la arteria carótida, trombosis del seno, o síndrome de Wallenberg), hemorragia cerebral (p. ej., hematoma epidural o subdural, o hemorragia subaracnoidea), infarto cerebral, isquemia cerebral (p. ej., isquemia cerebral transitoria, síndrome de robo de la subclavia o insuficiencia vertebrobasilar), demencia vascular (p. ej., multi-infarto), leucomalacia, periventricular, y dolor de cabeza vascular (p. ej., cefalea en racimos o migraña).

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la utilización de proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, con fines terapéuticos, por ejemplo, para estimular la proliferación y/o diferenciación de las células neurológicas. Por lo tanto, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para tratar y/o detectar enfermedades neurológicas. Por otra parte, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de

albúmina de la invención, se pueden utilizar como un marcador o detector de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso en particular.

Los ejemplos de las enfermedades neurológicas que se pueden tratar o detectar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, enfermedades cerebrales, tales como enfermedades cerebrales metabólicas que incluyen fenilcetonuria, tal como fenilcetonuria materna, deficiencia de piruvato carboxilasa, deficiencia de complejo piruvato deshidrogenasa, encefalopatía de Wernicke, edema cerebral, neoplasmas cerebrales tales como neoplasmas cerebelares que incluyen neoplasmas infratentoriales, neoplasmas del ventrículo cerebral tales como neoplasmas del plexo coroideo, neoplasmas hipotalámicos, neoplasmas supratentoriales, enfermedad de Canavan, enfermedades cerebelares tales como ataxia cerebelosa, que incluyen la degeneración espinocerebelosa tales como ataxia telangiectasia, disineria cerebelosa, ataxia de Friederich, enfermedad de Machado-Joseph, atrofia olivopontocerebelar, neoplasmas cerebelares tales como neoplasmas infratentoriales, esclerosis cerebral difusa, tal como encefalitis periaxialis, leucodistrofia de células globosas, leucodistrofia metacromática y panencefalitis esclerosante subaguda.

Las enfermedades neurológicas adicionales que se pueden tratar o detectar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen trastornos cerebrovasculares (tales como enfermedades de la arteria carótida que incluyen trombosis de la arteria carótida, estenosis de la carótida y enfermedad de Moyamoya), angiopatía amiloide cerebral, aneurisma cerebral, anoxia cerebral, arteriosclerosis cerebral, malformaciones arteriovenosas cerebrales, enfermedades de la arteria cerebral, embolia cerebral y trombosis tales como trombosis de la arteria carótida, trombosis del seno y síndrome de Wallenberg, hemorragia cerebral tal como hematoma epidural, hematoma subdural y hemorragia subaracnoidea, infarto cerebral, isquemia cerebral tal como isquemia cerebral transitoria, síndrome de robo de la subclavia e insuficiencia vertebrobasilar, demencia vascular tal como demencia multi-infarto, leucomalacia periventricular, dolor de cabeza vascular tal como cefalea en racimos y migraña.

Las enfermedades neurológicas adicionales que se pueden tratar o detectar con proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen demencias tales como complejo de demencias por SIDA, demencias preseniles, tales como enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Creutzfeldt-Jakob, demencias seniles tales como enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear progresiva, demencias vasculares tales como demencia multi-infarto, encefalitis, que incluyen encefalitis periaxialis, encefalitis virales, tales como encefalitis epidémica, encefalitis japonesa, encefalitis de St. Louis, encefalitis transmitida por garrapatas y fiebre del Nilo occidental, encefalomiелitis aguda diseminada, meningoencefalitis tales como síndrome uveomeningoencefálico, enfermedad de Parkinson postencefálica y panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomalacia tal como leucomalacia periventricular, epilepsias tales como epilepsia generalizada, que incluye espasmos infantiles, epilepsia de ausencia, epilepsia mioclónica que incluye síndrome MERRF, epilepsia tónico-clónica, epilepsias parciales tales como la epilepsia parcial compleja, epilepsia del lóbulo frontal y epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia postraumática, estado epiléptico tal como epilepsia parcial continua, y síndrome de Hallervorden-Spatz.

Otras enfermedades neurológicas que se pueden tratar o detectar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen hidrocefalia tal como Síndrome de Dandy-Walker e hidrocefalia de presión normal, enfermedades hipotalámicas tales como neoplasmas hipotalámicos, malaria cerebral, narcolepsia, que incluye cataplexia, poliomiелitis bulbar, pseudotumor cerebral, Síndrome de Rett, Síndrome de Reye, enfermedades talámicas, toxoplasmosis cerebral, tuberculoma intracraneal y síndrome de Zellweger, infecciones del sistema nervioso central, tales como complejo de demencias por SIDA, absceso cerebral, empiema subdural, encefalomiелitis tales como Encefalomiелitis equina, encefalomiелitis equina venezolana, Encefalomiелitis hemorrágica necrotizante, Visna, y malaria cerebral.

Otras enfermedades neurológicas que se pueden tratar o detectar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen meningitis tal como aracnoiditis, meningitis asépticas tales como meningitis viral que incluye la coriomeningitis linfocítica, meningitis bacteriana que incluye meningitis por Haemophilus, meningitis por Listeria, Meningitis meningocócicas tales como síndrome de Waterhouse-Friderichsen, meningitis neumocócica y tuberculosis meníngea, meningitis por hongos tales como meningitis por Cryptococcus, derrame subdural, meningoencefalitis, tales como síndrome uveomeningoencefálico, miелitis tales como miелitis transversa, neurosífilis, tal como tabes dorsal, poliomiелitis que incluye poliomiелitis bulbar y síndrome postpoliomiелitis, enfermedades priónicas (tales como el síndrome de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía espongiiforme bovina, el síndrome de Gerstmann-Straussler, Kuru, Scrapie), y toxoplasmosis cerebral.

Otras enfermedades neurológicas adicionales que se pueden tratar o detectar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen los tumores del sistema nervioso central tales como neoplasmas cerebrales que incluyen neoplasmas cerebelares tales como neoplasias infratentoriales, neoplasmas del ventrículo cerebral tales como neoplasmas del plexo coroideo, neoplasmas hipotalámicos y neoplasmas supratentoriales, neoplasmas meníngeos, neoplasmas de la médula espinal que incluyen neoplasmas epidurales, enfermedades desmielinizantes tales como las enfermedades de Canavan, esclerosis cerebral difusa que incluye adrenoleucodistrofia, encefalitis periaxialis, leucodistrofia de células

globosas, esclerosis cerebral difusa tal como leucodistrofia metacromática, encefalomiелitis alérgica, encefalomiелitis hemorrágica necrotizante, leucoencefalopatía multifocal progresiva, esclerosis múltiple, mielinólisis pontina central, miелitis transversa, neuromiелitis óptica, Scrapie, Swayback, síndrome de fatiga crónica, Visna, síndrome nervioso de alta presión, meningismo, enfermedades de la médula espinal como amiotonía congénita, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal tal como enfermedad de Werdnig-Hoffmann, compresión de la médula espinal, neoplasmas de la médula espinal tales como neoplasmas epidurales, siringomiелia, Tabes Dorsalis, síndrome de la persona rígida, retraso mental, tal como el síndrome de Angelman, síndrome de Cri-du-Chat, síndrome de de Lange, Síndrome de Down, gangliosidosis tales como gangliosidosis G (M1), enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Hartnup, homocistinuria, síndrome de Laurence-Moon-Biedl, síndrome de Lesch-Nyhan, enfermedad de la orina de jarabe de arce, mucopolidosis tal como fucosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, síndrome oculocerebrorenal, fenilcetonuria tal como fenilcetonuria materna, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Rett, síndrome de Rubinstein-Taybi, esclerosis tuberosa, síndrome WAGR, anomalías del sistema nervioso tales como holoprosencefalia, defectos del tubo neural tal como la anencefalia que incluye hidrangocefalia, deformidad de Arnold-Chairi, encefalocele, meningocele, mielomeningocele, espina bífida, tal como espina bífida quística y espina bífida oculta.

Otras enfermedades neurológicas adicionales que se pueden tratar o detectar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen neuropatías motoras y sensoriales hereditarias que incluyen enfermedad de Charcot-Marie, atrofia óptica hereditaria, enfermedad de Refsum, paraplejia espástica hereditaria, enfermedad de Werdnig-Hoffmann y neuropatías sensoriales y autónomas hereditarias tales como analgesia congénita y disautonomía familiar, manifestaciones neurológicas (como agnosia que incluyen síndrome de Gerstmann, amnesia tal como amnesia retrógrada, apraxia, vejiga neurogénica, cataplejia, trastornos de comunicación, tales como trastornos de la audición que incluyen sordera, sordera parcial, reclutamiento de sonoridad y tinnitus, trastornos del lenguaje tales como afasia, que incluye agrafia, anomia, afasia de Broca y afasia de Wernicke, dislexia, tal como dislexia adquirida, trastornos del desarrollo del lenguaje, trastornos del habla como la afasia que incluye anomia, afasia de Broca y afasia de Wernicke, trastornos de la articulación, trastornos de la comunicación tales como trastornos del habla, que incluyen disartria, ecolalia, mutismo y tartamudeo, trastornos de la voz, tales como afonía y ronquera, estado de descerebración, delirio, fasciculación, alucinaciones, meningismo, trastornos del movimiento tales como síndrome de Angelman, ataxia, atetosis, corea, distonía, hipocinesia, hipotonía muscular, mioclonos, tic, torticólis y temblor, hipertonía muscular, tal como rigidez muscular tal como síndrome de la persona rígida, espasticidad muscular, parálisis tal como parálisis facial que incluye Herpes Zoster ótico, gastroparesia, hemiplejia, oftalmoplejia como diplopía, síndrome de Duane, síndrome de Horner, oftalmoplejia externa progresiva crónica tal como síndrome de Kearns, parálisis bulbar, paraparesia espástica tropical, paraplejia, tal como síndrome de Brown-Sequard, tetraplejia, parálisis respiratoria y parálisis de las cuerdas vocales, paresia, miembro fantasma, trastornos del gusto, tales como agnosia y disgeusia, trastornos de la visión tales como la ambliopía, ceguera, defectos de la visión del color, diplopía, hemianopsia, escotoma y visión subnormal, trastornos del sueño como la hipersomnia que incluye el síndrome de Kleine-Levin, insomnio, y sonambulismo, espasmos tales como trismo, pérdida del conocimiento, tal como coma, estado vegetativo persistente y síncope y vértigo, enfermedades neuromusculares tales como la amiotonía congénita, esclerosis lateral amiotrófica, el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad de las neuronas motoras, atrofia muscular, tal como la atrofia muscular espinal, enfermedad de Charcot-Marie y la enfermedad de Werdnig-Hoffmann, síndrome de postpoliomiелitis, distrofia muscular, miastenia gravis, miotonía atrófica, miotonía congénita, miopatía nemalínica, parálisis periódica familiar, paramioclono múltiple, paraparesia espástica tropical y síndrome de la persona rígida, enfermedades del sistema nervioso periférico, tales como acrodinia, neuropatías amiloides, enfermedades del sistema nervioso autónomo, tales como síndrome de Adie, síndrome de Barré-Lieou, disautonomía familiar, síndrome de Horner, distrofia simpática refleja y síndrome de Shy-Drager, enfermedades de los nervios craneales tales como enfermedades del nervio acústico, tales como neuroma acústico que incluye Neurofibromatosis 2, enfermedades del nervio facial tales como neuralgia facial, síndrome de Melkelsson-Rosenthal, trastornos de la motilidad ocular, que incluyen ambliopía, nistagmo, parálisis del nervio oculomotor, oftalmoplejia tal como el Síndrome de Duane, síndrome de Horner, oftalmoplejia externa crónica progresiva que incluye síndrome de Kearns, estrabismos tales como esotropía y exotropía, parálisis del nervio oculomotor, enfermedades del nervio óptico, tales como atrofia óptica que incluye atrofia óptica hereditaria, drusen del disco óptico, neuritis óptica, tal como neuromiелitis óptica, edema de papila, neuralgia del trigémino, parálisis de las cuerdas vocales, enfermedades desmielinizantes como neuromiелitis óptica y Swayback, y neuropatías diabéticas tales como pie diabético.

Otras enfermedades neurológicas adicionales que se pueden tratar o detectar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen los síndromes de compresión del nervio tales como el síndrome del túnel carpiano, síndrome del túnel tarsiano, síndrome de salida torácica, tal como síndrome de la costilla cervical, síndrome de compresión del nervio cubital, neuralgia tal como causalgia, neuralgia cervico-braquial, neuralgia facial y neuralgia del trigémino, neuritis, tal como neuritis alérgica experimental, neuritis óptica, polineuritis, polirradiculoneuritis y radiculitis tal como polirradiculitis, neuropatías sensoriales y motoras hereditarias tales como enfermedad de Charcot-Marie, atrofia óptica hereditaria de atrofia, enfermedad de Refsum, paraplejia espástica hereditaria y enfermedad de Werdnig-Hoffmann, neuropatías autónomas y sensoriales hereditarias que incluyen analgesia congénita y disautonomía familiar, síndrome POEMS, ciática, sudoración gustativa y tetania).

Trastornos endocrinos

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para tratar, prevenir, diagnosticar, y/o pronosticar trastornos y/o enfermedades relacionadas con el desequilibrio hormonal, y/o trastornos o enfermedades del sistema endocrino.

- 5 Las hormonas secretadas por las glándulas del sistema endocrino controlan el crecimiento físico, la función sexual, el metabolismo y otras funciones. Los trastornos se pueden clasificar de dos formas: alteraciones en la producción de hormonas, e incapacidad de los tejidos para responder a las hormonas. La etiología de estas enfermedades, trastornos o afecciones de desequilibrio hormonal o del sistema endocrino puede ser genética, somática, tal como el cáncer y algunas enfermedades autoinmunitarias, adquirida (p. ej., por quimioterapia, lesión o toxinas) o infecciosa.
- 10 Por otra parte, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar como un marcador o detector de una enfermedad o trastorno concretos relacionados con el sistema endocrino y/o el desequilibrio hormonal.

- Las enfermedades del sistema endocrino y/o el desequilibrio hormonal abarcan trastornos de la motilidad uterina, incluyendo, pero no limitados a: complicaciones con el embarazo y el parto (p. ej., parto prematuro, embarazo a término, aborto espontáneo, y parto lento o detenido); y trastornos y/o enfermedades del ciclo menstrual (p. ej., dismenorrea y endometriosis).
- 15

- Los trastornos y/o enfermedades del sistema endocrino y/o el desequilibrio hormonal incluyen trastornos y/o enfermedades del páncreas, tales como, por ejemplo, diabetes mellitus, diabetes insípida, agenesia pancreática congénita, feocromocitoma-síndrome de tumor de células de los islotes; trastornos y/o enfermedades de las glándulas suprarrenales tales como, por ejemplo, enfermedad de Addison, deficiencia de corticoesteroides, enfermedad virilizante, hirsutismo, síndrome de Cushing, hiperaldosteronismo, feocromocitoma; trastornos y/o enfermedades de la glándula pituitaria, tales como, por ejemplo, hiperpituitarismo, hipopituitarismo, enanismo pituitario, adenoma de la pituitaria, panhipopituitarismo, acromegalia, gigantismo; trastornos y/o enfermedades de tiroides, que incluyen pero no se limitan a, hipertiroidismo, hipotiroidismo, enfermedad de Plummer, enfermedad de Graves (bocio difuso tóxico), bocio tóxico nodular, tiroiditis (tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis granulomatosa subaguda y tiroiditis linfocítica silenciosa), síndrome de Pendred, mixedema, cretinismo, tirotoxicosis, defecto de acoplamiento de hormona tiroidea, aplasia tímica, tumores de células de Hürthle de tiroides, cáncer de tiroides, carcinoma de tiroides, carcinoma medular de tiroides; trastornos y/o enfermedades de la paratiroides, tales como, por ejemplo, hiperparatiroidismo, hipoparatiroidismo; trastornos y/o enfermedades del hipotálamo.
- 20
- 25

- Adicionalmente, los trastornos y/o enfermedades del sistema endocrino y/o el desequilibrio hormonal también pueden incluir trastornos y/o enfermedades de los testículos o los ovarios, incluyendo cáncer. Otros trastornos y/o enfermedades de los testículos o los ovarios incluyen adicionalmente, por ejemplo, cáncer de ovario, síndrome de ovario poliquístico, síndrome de Klinefelter, síndrome de los testículos desaparecidos (anorquia bilateral), ausencia congénita de células de Leydig, criptorquidia, síndrome de Noonan, distrofia miotónica, hemangioma capilar del testículo (benigno), neoplasias de los testículos y neo-testículos.
- 30
- 35

Por otra parte, los trastornos y/o enfermedades del sistema endocrino y/o el desequilibrio hormonal también pueden incluir trastornos y/o enfermedades tales como, por ejemplo, síndromes de deficiencia poliglandular, feocromocitoma, neuroblastoma, neoplasia endocrina múltiple, y trastornos y/o cánceres de tejidos endocrinos.

- En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar enfermedades endocrinas y/o trastornos asociados con el tejido o los tejidos en los que se expresa la proteína Terapéutica que corresponde a la porción de proteína terapéutica de la proteína de la albúmina de la invención.
- 40

Trastornos del aparato reproductor

- Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser utilizados para el diagnóstico, tratamiento, o prevención de enfermedades y/o trastornos del sistema reproductor. Los trastornos del sistema reproductor que se pueden tratar por medio de las composiciones de la invención, incluyen, pero no se limitan a, lesiones del sistema reproductor, infecciones, trastornos neoplásicos, defectos congénitos, y las enfermedades o trastornos que dan como resultado infertilidad, complicaciones con el embarazo, el parto, o alumbramiento, y dificultades postparto.
- 45

- Los trastornos y/o enfermedades del sistema reproductor incluyen enfermedades y/o trastornos de los testículos, incluyendo atrofia testicular, feminización testicular, criptorquidia (unilateral y bilateral), anorquia, testículos ectópicos, epididimitis y orquitis (típicamente como resultado de infecciones, tales como, por ejemplo, gonorrea, paperas, tuberculosis y sífilis), torsión testicular, vasitis nodosa, tumores de células germinales (p. ej., seminomas, carcinomas de células embrionarias, teratocarcinomas, coriocarcinomas, tumores del saco vitelino, y teratomas), tumores estromales (p. ej., tumores de células de Leydig), hidrocele, hematocele, varicocele, espermatocoele, hernia inguinal y trastornos de la producción de esperma (p. ej., el síndrome de inmovilidad ciliar, aspermia, astenozoospermia, azoospermia, oligospermia, y teratozoospermia).
- 50
- 55

Los trastornos del aparato reproductor también incluyen trastornos de la glándula de la próstata, tales como prostatitis aguda no bacteriana, prostatitis crónica no bacteriana, prostatitis bacteriana aguda, prostatitis bacteriana crónica, prostatodistonia, prostatosis, prostatitis granulomatosa, malacoplaquia, hipertrofia o hiperplasia benigna de próstata, y trastornos neoplásicos de la próstata, incluyendo adenocarcinomas, carcinomas de células transicionales, carcinomas ductales y carcinomas de células escamosas.

Adicionalmente, las composiciones de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de trastornos o enfermedades del pene y la uretra, que incluyen trastornos inflamatorios, tales como balanopostitis, balanitis xerótica obliterante, fimosis, parafimosis, sífilis, virus del herpes simple, gonorrea, uretritis no gonocócica, clamidia, micoplasma, tricomonas, VIH, SIDA, síndrome de Reiter, condiloma acuminado, condiloma latum, y pápulas perladas del pene; anomalías uretrales, tales como hipospadias, epispadias, y fimosis; lesiones premalignas, incluyendo eritroplasia de Queyrat, enfermedad de Bowen, papilosis bowenoide, condiloma gigante de Buscke-Lowenstein, y carcinoma verrugoso; cánceres de pene, incluyendo los carcinomas de células escamosas, carcinoma in situ, carcinoma verrugoso y carcinoma de pene diseminado; trastornos neoplásicos de la uretra, incluyendo carcinoma uretral de pene, carcinoma uretral bulbomembranoso, y carcinoma uretral prostático; y trastornos eréctiles, tales como priapismo, enfermedad de Peyronie, disfunción eréctil e impotencia.

Por otra parte, las enfermedades y/o trastornos de los vasos deferentes incluyen vasculitis y ABCCD (ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes); además, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser utilizados en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de enfermedades y/o trastornos de las vesículas seminales, que incluyen enfermedad hidatídica, clorhidrorrea congénita y enfermedad renal poliquística.

Otros trastornos y/o enfermedades del sistema reproductor masculino incluyen, por ejemplo, el síndrome de Klinefelter, síndrome de Young, eyaculación prematura, diabetes mellitus, fibrosis quística, síndrome de Kartagener, fiebre elevada, esclerosis múltiple y ginecomastia.

Adicionalmente, los polinucleótidos, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de enfermedades y/o trastornos de la vagina y vulva, incluyendo vaginosis bacteriana, vaginitis por Candida, virus del herpes simple, chancroide, granuloma inguinal, linfogranuloma venéreo, sarna, virus del papiloma humano, trauma vaginal, trauma vulvar, adenosis, vaginitis por clamidia, gonorrea, vaginitis por tricomonas, condiloma acuminado, sífilis, molusco contagioso, vaginitis atrófica, enfermedad de Paget, liquen escleroso, liquen plano, vulvodinia, síndrome de choque tóxico, vaginismo, vulvovaginitis, vestibulitis vulvar, y trastornos neoplásicos, tales como hiperplasia de células escamosas, carcinoma de células claras, carcinoma de células basales, melanomas, cáncer de la glándula de Bartolino, y neoplasia intraepitelial vulvar.

Los trastornos y/o enfermedades del útero incluyen dismenorrea, retroversión del útero, endometriosis, fibroides, adenomiosis, sangrado anovulatorio, amenorrea, síndrome de Cushing, mola hidatidiforme, síndrome de Asherman, menopausia prematura, pubertad precoz, pólipos uterinos, hemorragia uterina disfuncional (p. ej., debido a señales hormonales aberrantes), y trastornos neoplásicos, tales como adenocarcinomas, leiomiomas, y sarcomas. Adicionalmente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles como marcador o detector, así como en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de las anomalías uterinas congénitas, tales como útero bicorne, útero septado, útero simple unicornio, útero unicornio con un cuerno rudimentario no cavitario, útero unicornio con un cuerno rudimentario cavitario no comunicante, útero unicornio con un cuerno cavitario comunicante, útero en forma de arco, útero didelfo y útero en forma de T.

Las enfermedades y/o trastornos de ovario incluyen anovulación, síndrome de ovario poliquístico (síndrome de Stein-Leventhal), quistes ováricos, hipofunción ovárica, falta de sensibilidad ovárica a las gonadotropinas, sobreproducción ovárica de andrógenos, síndrome de la vena ovárica derecha, amenorrea, hirsutismo, y cáncer de ovario (incluyendo, pero no limitado a, crecimiento canceroso primario y secundario, tumores de Sertoli-Leydig, carcinoma endometrial del ovario, adenocarcinoma seroso papilar ovárico, adenocarcinoma mucinoso ovárico, y tumores de ovario de Krukenberg).

Las enfermedades y/o trastornos del cuello del útero incluyen cervicitis, cervicitis crónica, cervicitis mucopurulenta, displasia cervical, pólipos cervicales, quistes de Nabothian, erosión cervical, incompetencia cervical, y neoplasmas cervicales (que incluyen, por ejemplo, carcinoma cervical, metaplasia escamosa, carcinoma de células escamosas, neoplasia celular adenoescamosa, y neoplasia de células columnares).

Además, las enfermedades y/o trastornos del sistema reproductor incluyen trastornos y/o enfermedades del embarazo, incluyendo aborto involuntario y muerte fetal, tal como aborto precoz, aborto tardío, aborto espontáneo, aborto inducido, aborto terapéutico, amenaza de aborto, aborto retenido, aborto incompleto, aborto completo, aborto habitual, aborto retenido y aborto séptico; embarazo ectópico, anemia, incompatibilidad de Rh, sangrado vaginal durante el embarazo, diabetes gestacional, retraso del crecimiento intrauterino, polihidramnios, síndrome HELLP, desprendimiento prematuro de placenta, placenta previa, hiperemesis, preeclampsia, eclampsia, herpes gestacional, y la urticaria del embarazo. Además, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que

codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de enfermedades que pueden complicar el embarazo, incluyendo enfermedad cardíaca, insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática, enfermedad cardíaca congénita, prolapso de la válvula mitral, presión arterial alta, anemia, enfermedades renales, enfermedades infecciosas (p. ej., rubéola, citomegalovirus, toxoplasmosis, hepatitis infecciosa, clamidia, VIH, SIDA y herpes genital), diabetes mellitus, enfermedad de Graves, tiroiditis, hipotiroidismo, tiroiditis de Hashimoto, hepatitis activa crónica, cirrosis hepática, cirrosis biliar primaria, asma, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, miastenia grave, púrpura trombocitopénica idiopática, apendicitis, quistes ováricos, trastornos de la vesícula biliar, y obstrucción del intestino.

Entre las complicaciones asociadas con el parto y el alumbramiento se incluyen ruptura prematura de membranas, parto prematuro, embarazo prolongado, post-madurez, parto que avanza muy lentamente, sufrimiento fetal (p. ej., ritmo cardíaco anormal (fetal o materno), problemas respiratorios, y posición anormal del feto), distocia de hombros, prolapso del cordón umbilical, embolia de líquido amniótico y sangrado uterino anormal.

Además, las enfermedades y/o trastornos del período posparto, incluyendo endometritis, miometritis, parametritis, peritonitis, tromboflebitis pélvica, embolia pulmonar, endotoxemia, pielonefritis, tromboflebitis safena, mastitis, cistitis, hemorragia después del parto, y útero invertido.

Otros trastornos y/o enfermedades del sistema reproductor femenino que se pueden diagnosticar, tratar y/o prevenir por medio de las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, por ejemplo, síndrome de Turner, pseudohermafroditismo, síndrome premenstrual, enfermedad inflamatoria pélvica, congestión pélvica (congestión vascular), frigidez, anorgasmia, dispareunia, rotura de trompa de Falopio, y dolor abdominal durante la ovulación.

Enfermedad infecciosa

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para tratar o detectar agentes infecciosos. Por ejemplo, mediante el aumento de la respuesta inmunitaria, en particular el aumento de la proliferación y diferenciación de células B y/o T, se pueden tratar las enfermedades infecciosas. La respuesta inmunitaria se puede aumentar o bien potenciando una respuesta inmunitaria existente o bien iniciando una nueva respuesta inmunitaria. Alternativamente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden inhibir directamente el agente infeccioso, sin provocar necesariamente una respuesta inmunitaria.

Los virus son un ejemplo de un agente infeccioso que puede causar enfermedad o síntomas que se pueden tratar o detectar mediante las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Los ejemplos de virus, incluyen, pero no se limitan a los siguientes virus de ADN y ARN y familias virales: Arbovirus, Adenoviridae, Arenaviridae, Arterivirus, Birnaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Dengue, EBV, HIV, Flaviviridae, Hepadnaviridae (hepatitis), Herpesviridae (tales como, Cytomegalovirus, Herpes Simplex, Herpes Zoster), Mononegavirus (p. ej., Paramyxoviridae, Morbillivirus, Rhabdoviridae), Orthomyxoviridae (p. ej., Influenza A, Influenza B, y parainfluenza), virus de Papiloma, Papovaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poxviridae (tales como viruela o vaccinia), Reoviridae (p. ej., Rotavirus), Retroviridae (HTLV-I, HTLV-II, Lentivirus) y Togaviridae (p. ej., Rubivirus). Los virus incluidos en estas familias pueden causar una variedad de enfermedades o síntomas, incluyendo, pero no limitados a: artritis, bronquiolitis, virus sincitial respiratorio, encefalitis, infecciones oculares (p. ej., conjuntivitis, queratitis), síndrome de fatiga crónica, hepatitis (A, B, C, E, crónica activa, delta), encefalitis japonesa B, Junin, Chikungunya, fiebre del Valle del Rift, fiebre amarilla, meningitis, infecciones oportunistas (p. ej., SIDA), neumonía, linfoma de Burkitt, varicela, fiebre hemorrágica, sarampión, paperas, parainfluenza, rabia, resfriado común, polio, leucemia, rubeola, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (p. ej., Kaposi, verrugas) y viremia. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para tratar o detectar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para tratar: meningitis, dengue, EBV y/o hepatitis (p. ej., hepatitis B). En una realización adicional las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para tratar a los pacientes que no responden a una o más de otras vacunas contra la hepatitis disponibles comercialmente. En una realización específica adicional las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para tratar el SIDA.

De manera similar, los agentes bacterianos y fúngicos que pueden causar enfermedades o síntomas y que se pueden tratar o detectar por medio de las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, las siguientes bacterias gram positivas y gram negativas, familias de bacterias y hongos: Actinomyces (p. ej., Norcardia), Acinetobacter, *Cryptococcus neoformans*, Aspergillus, Bacillaceae (p. ej., *Bacillus anthracis*), Bacteroides (p. ej., *Bacteroides fragilis*), Blastomycosis, Bordetella, Borrelia (p. ej., *Borrelia burgdorferi*), Brucella, Candida, Campylobacter, Chlamydia, Clostridium (p. ej., *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*), Coccidioides, Corynebacterium (p. ej., *Corynebacterium diphtheriae*), Cryptococcus, Dermatocycosis, *E. coli*

(p. ej., *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enterohemorrágica), Enterobacter (p. ej., *Enterobacter aerogenes*), Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella (p. ej., *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*), Serratia, Yersinia, Shigella), Erysipelothrix, Haemophilus (p. ej., *Haemophilus influenza* tipo B), Helicobacter, Legionella (p. ej., *Legionella pneumophila*), Leptospira, Listeria (p. ej., *Listeria monocytogenes*), Mycoplasma, Mycobacterium (p. ej., *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*), Vibrio (p. ej., *Vibrio cholerae*), Neisseriaceae (p. ej., *Neisseria gonorrhea*, *Neisseria meningitidis*), Pasteurellaceae, Proteus, Pseudomonas (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*), Rickettsiaceae, espiroquetas (p. ej., Treponema spp., Leptospira spp., Borrelia spp.), Shigella spp., Staphylococcus (p. ej., *Staphylococcus aureus*), Meningococcus, Pneumococcus y Streptococcus (p. ej., *Streptococcus pneumoniae* y los Grupos A, B, y C de estreptococos), y ureaplasmas. Estas familias bacterianas, parasitarias y fúngicas pueden causar enfermedades o síntomas, incluyendo, pero no limitados a: las infecciones resistentes a los antibióticos, bacteriemia, endocarditis, septicemia, infecciones oculares (p. ej., conjuntivitis), uveítis, tuberculosis, gingivitis, diarrea bacteriana, infecciones oportunistas (p. ej., infecciones relacionadas con SIDA), paroniquia, infecciones relacionadas con prótesis, caries dental, enfermedad de Reiter, infecciones de las vías respiratorias, como la tos ferina o empiema, sepsis, enfermedad de Lyme, enfermedad por arañazo de gato, disentería, fiebre paratifoidea, envenenamiento por alimentos, enfermedad Legionella, inflamación crónica y aguda, eritema, infecciones por levadura, fiebre tifoidea, neumonía, gonorrhea, meningitis (p. ej., meningitis tipos A y B), clamidia, sífilis, difteria, lepra, brucelosis, úlceras pépticas, ántrax, abortos espontáneos, defectos de nacimiento, neumonía, infecciones pulmonares, infecciones del oído, sordera, ceguera, letargo, malestar, vómitos, diarrea crónica, enfermedad de Crohn, colitis, vaginosis, esterilidad, enfermedades inflamatorias de la pelvis, candidiasis, paratuberculosis, tuberculosis, lupus, botulismo, gangrena, tétanos, impétigo, fiebre reumática, escarlatina, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (p. ej., celulitis, dermatomycosis), toxemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas, infecciones nosocomiales. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para tratar o detectar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se utilizan para tratar: tétanos, difteria, botulismo y/o meningitis de tipo B.

Por otra parte, los agentes parásitos que causan enfermedades o síntomas que se pueden tratar, prevenir y/o diagnosticar por medio de las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias o clases: amebiasis, babesiosis, coccidiosis, criptosporidiosis, dientamoebiasis, durina, ectoparásitos, giardias, helmintiasis, leishmaniasis, Schistosoma, teileriasis, toxoplasmosis, tripanosomiasis, y Trichomonas y esporozoos (p. ej., *Plasmodium virax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*). Estos parásitos pueden causar una variedad de enfermedades o síntomas, incluyendo, pero no limitados a: sarna, trombiculiasis, infecciones oculares, enfermedad intestinal (p. ej., disentería, giardiasis), enfermedad hepática, enfermedad pulmonar, infecciones oportunistas (p. ej., relacionadas con el SIDA), malaria, complicaciones del embarazo y toxoplasmosis. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para tratar, prevenir y/o diagnosticar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan para tratar, prevenir y/o diagnosticar la malaria.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se podrían utilizar o bien mediante la administración de una cantidad eficaz de una proteína de fusión de albúmina de la invención al paciente, o bien mediante la eliminación de células del paciente, el suministro a las células de un polinucleótido de la presente invención, y la devolución de las células modificadas al paciente (terapia ex vivo). Por otra parte, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar como un antígeno en una vacuna para originar una respuesta inmunitaria contra enfermedades infecciosas.

Regeneración

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para diferenciar, proliferar, y atraer células, llevando a la regeneración de los tejidos. (Véase, Science 276: 59-87 (1997)). La regeneración de tejidos se podría utilizar para reparar, sustituir o proteger el tejido dañado por defectos congénitos, trauma (heridas, quemaduras, incisiones o úlceras), edad, enfermedad (p. ej., osteoporosis, osteoartritis, enfermedad periodontal, insuficiencia hepática), cirugía, incluyendo la cirugía plástica cosmética, fibrosis, lesión por reperusión o daño sistémico de citoquinas.

Los tejidos que se podrían regenerar utilizando la presente invención incluyen órganos (p. ej., páncreas, hígado, intestino, riñón, piel, endotelio), músculo (liso, esquelético o cardíaco), vasculatura (incluyendo vascular y linfática), tejido nervioso, hematopoyético, y esquelético (hueso, cartílago, tendón y ligamento). Preferiblemente, la regeneración se produce sin cicatrización o con una cicatrización reducida. La regeneración también puede incluir angiogénesis.

Por otra parte, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, pueden aumentar la regeneración de tejidos difíciles de curar. Por ejemplo, el aumento de la regeneración del tendón/ligamento podría acelerar el tiempo de recuperación después de los daños. Las proteínas

de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se podrían utilizar profilácticamente en un esfuerzo por evitar el daño. Las enfermedades específicas que podrían ser tratadas incluyen tendinitis, síndrome del túnel carpiano y otros defectos de tendones o ligamentos. Un ejemplo adicional de regeneración del tejido de las heridas que no cicatrizan incluye úlceras de presión, úlceras asociadas con insuficiencia vascular, quirúrgicas y heridas traumáticas.

De manera similar, los tejidos nervioso y cerebral también se podrían regenerar mediante el uso de proteínas de fusión de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, para proliferar y diferenciar células nerviosas. Las enfermedades que se podrían tratar mediante este método incluyen enfermedades del sistema nervioso central y periférico, neuropatías, o trastornos mecánicos y traumáticos (p. ej., trastornos de la médula espinal, trauma en la cabeza, enfermedad cerebrovascular, y accidente cerebrovascular). Específicamente, las enfermedades asociadas con las lesiones de nervios periféricos, neuropatía periférica (p. ej., resultante de quimioterapia u otras terapias médicas), neuropatías localizadas, y enfermedades del sistema nervioso central (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, y síndrome de Shy-Drager), se podrían tratar todos utilizando las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Trastornos gastrointestinales

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden utilizar para tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar trastornos gastrointestinales, incluyendo enfermedades inflamatorias y/o afecciones, infecciones, cánceres (p. ej., neoplasmas intestinales (tumor carcinoide del intestino delgado, linfoma no Hodgkin del intestino delgado, linfoma del intestino delgado)), y úlceras, tales como úlceras pépticas.

Los trastornos gastrointestinales incluyen disfagia, odinofagia, inflamación del esófago, esofagitis péptica, reflujo gástrico, fibrosis submucosa y estenosis, lesiones de Mallory-Weiss, leiomiomas, lipomas, cánceres epidérmicos, adenocarcinomas, trastornos de retención gástrica, gastroenteritis, atrofia gástrica, cánceres gástricos/de estómago, pólipos de estómago, trastornos autoinmunitarios como la anemia perniciosa, estenosis pilórica, gastritis (bacteriana, viral, eosinofílica, inducida por el estrés, erosiva crónica, de células plasmáticas, y de Menetrier), y enfermedades peritoneales (p. ej., quilooperitoneo, hemoperitoneo, quiste mesentérico, linfadenitis mesentérica, oclusión vascular mesentérica, paniculitis, neoplasmas, peritonitis, neumoperitoneo, absceso subfrénico).

Los trastornos gastrointestinales incluyen también trastornos asociados con el intestino delgado, tales como los síndromes de mala absorción, distensión, síndrome de intestino irritable, intolerancia al azúcar, enfermedad celíaca, úlceras duodenales, duodenitis, esprue tropical, enfermedad de Whipple, linfangiectasia intestinal, enfermedad de Crohn, apendicitis, obstrucciones del íleo, divertículo de Meckel, divertículos múltiples, fracaso de la rotación completa del intestino delgado y grueso, linfoma, y enfermedades bacterianas y parasitarias (tales como diarrea del viajero, fiebre tifoidea y paratifoidea, cólera, infecciones por gusanos redondos (*Ascaridiasis lumbricoides*), anquilostomas (*Ancylostoma duodenale*), nematodos (*Enterobius vermicularis*), tenias (*Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Diphyllobothrium spp.*, y *T. solium*)).

Las enfermedades y/o trastornos del hígado incluyen colestasis intrahepática (síndrome de Alagille, cirrosis hepática biliar), hígado graso (hígado graso no alcohólico, síndrome de Reye), trombosis de la vena hepática, degeneración hepatolenticular, hepatomegalia, síndrome hepatopulmonar, síndrome hepatorenal, hipertensión portal (várices esofágicas y gástricas), absceso hepático (absceso hepático amebiano), cirrosis hepática (alcohólica, biliar y experimental), enfermedades alcohólicas del hígado (hígado graso, hepatitis, cirrosis), parasitarias (equinococosis hepática, fascioliasis, absceso hepático amebiano), ictericia (hemolítica, hepatocelular y colestática), colestasis, hipertensión portal, agrandamiento del hígado, ascitis, hepatitis (hepatitis alcohólica, hepatitis animal, hepatitis crónica (autoinmunitaria, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, inducida por fármacos), hepatitis tóxica, hepatitis humana viral (hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, la hepatitis D, hepatitis E), enfermedad de Wilson, hepatitis granulomatosa, cirrosis biliar secundaria, encefalopatía hepática, hipertensión portal, varices, encefalopatía hepática, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, adenoma hepatocelular, hemangiomas, piedras biliares, insuficiencia hepática (encefalopatía hepática, insuficiencia hepática aguda), y neoplasmas hepáticos (angiomolipoma, metástasis hepáticas calcificadas, metástasis quísticas hepáticas, tumores epiteliales, hepatocarcinoma fibrolamelar, hiperplasia nodular focal, adenoma hepático, cistoadenoma hepatobiliar, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, hepatoma, cáncer de hígado, hemangioendotelioma hepático, hamartoma mesenquimal, tumores mesenquimales del hígado, hiperplasia nodular regenerativa, tumores hepáticos benignos (quistes hepáticos [quistes simples, enfermedad del hígado poliquístico, cistoadenoma hepatobiliar, quiste de colédoco], tumores mesenquimales [hamartoma mesenquimal, hemangioendotelioma infantil, hemangioma, peliosis hepática, lipomas, seudotumor inflamatorio, Varios], tumores epiteliales [epitelio de los conductos biliares (hamartoma del conducto biliar, adenoma de las vías biliares), hepatocitos (adenoma, hiperplasia nodular focal, hiperplasia nodular regenerativa)], tumores hepáticos malignos [hepatocelular, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, colangiocelular, colangiocarcinoma, citadenocarcinoma, tumores de los vasos sanguíneos, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, hemangioendotelioma, otros tumores, sarcoma embrionario, fibrosarcoma, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinosarcoma, teratoma, carcinoide, carcinoma escamoso, linfoma primario]),

peliosis hepática, porfiria eritropoyética, porfiria hepática (porfiria aguda intermitente, porfiria cutánea tardía), síndrome de Zellweger).

Las enfermedades y/o trastornos pancreáticos incluyen pancreatitis aguda, pancreatitis crónica (pancreatitis aguda necrotizante, pancreatitis alcohólica), neoplasmas (adenocarcinoma del páncreas, cistadenocarcinoma, insulinoma, gastrinoma, y glucagonoma, neoplasmas quísticos, tumores de células de los islotes, pancreoblastoma) y otras enfermedades pancreáticas (p. ej., fibrosis quística, quiste (pseudoquistes pancreáticos, fístula pancreática, insuficiencia)).

Las enfermedades de la vesícula biliar incluyen cálculos biliares (colelitiasis y coledocolitiasis), síndrome de poscolecistectomía, diverticulosis de la vesícula biliar, colecistitis aguda, colecistitis crónica, tumores del conducto biliar, y mucocoele.

Las enfermedades y/o trastornos del intestino grueso incluyen colitis asociada a antibióticos, diverticulitis, colitis ulcerosa, megacolon adquirido, abscesos, infecciones fúngicas y bacterianas, trastornos anorrectales (p. ej., fisuras, hemorroides), enfermedades del colon (colitis, neoplasmas de colon [cáncer de colon, pólipos adenomatosos de colon (p. ej., adenoma vellosos), carcinoma de colon, cáncer colorrectal], diverticulitis colónica, diverticulosis colónica, megacolon [enfermedad de Hirschsprung, megacolon tóxico]; enfermedades sigmoideas [proctocolitis, neoplasmas sigmoideas]), estreñimiento, enfermedad de Crohn, diarrea (diarrea infantil, disentería), enfermedades duodenales (neoplasias duodenales, obstrucción duodenal, úlcera duodenal, duodenitis), enteritis (enterocolitis), enteropatía por VIH, enfermedades ileales (neoplasias ileales, ileitis), enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado, enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), atresia intestinal, enfermedades parasitarias (anisakiasis, balantidiasis, infecciones por Blastocystis, criptosporidiosis, dientamoebiasis, disentería amebiana, giardiasis), fístula intestinal (fístula rectal), neoplasmas intestinales (neoplasmas cecales, neoplasias de colon, neoplasias duodenales, neoplasias ileales, pólipos intestinales, neoplasias yeyunales, neoplasias rectales), obstrucción intestinal (síndrome de asa aferente, obstrucción duodenal, heces impactadas, pseudo-obstrucción intestinal [vólvulo cecal], intususcepción), perforación intestinal, pólipos intestinales (pólipos colónicos, síndrome de Gardner, síndrome de Peutz-Jeghers), enfermedades yeyunales (neoplasmas yeyunales), síndromes de mala absorción (síndrome de bucle ciego, enfermedad celíaca, intolerancia a la lactosa, síndrome de intestino corto, esprue tropical, enfermedad de Whipple), oclusión vascular mesentérica, neumatosiis quística intestinal, enteropatías con pérdida de proteínas (linfagiectasis intestinal), enfermedades rectales (enfermedades del ano, incontinencia fecal, hemorroides, proctitis, fístula rectal, prolapso rectal, rectoceles), úlcera péptica (úlcera duodenal, esofagitis péptica, hemorragia, perforación, úlcera de estómago, síndrome de Zollinger-Ellison), síndromes gastrectomizados (síndrome de evacuación gástrica rápida), enfermedades del estómago (p. ej., aclorhidria, reflujo duodenogástrico (reflujo biliar), ectasia vascular antral gástrica, fístula gástrica, obstrucción de la salida gástrica, gastritis (atrófica o hipertrófica), gastroparesia, dilatación del estómago, divertículo en el estómago, neoplasmas del estómago (cáncer gástrico, pólipos gástricos, adenocarcinoma gástrico, pólipo gástrico hiperplásico), rotura del estómago, úlcera de estómago, vólvulo de estómago), tuberculosis, visceroptosis, vómitos (p. ej., hematemesis, hiperemesis gravídica, náuseas y vómitos postoperatorios) y colitis hemorrágica.

Otras enfermedades y/o trastornos del sistema gastrointestinal incluyen las enfermedades del tracto biliar, tales como, gastrosquias, fístula (p. ej., fístula biliar, fístula esofágica, fístula gástrica, fístula intestinal, fístula pancreática), neoplasias (p. ej., neoplasias del tracto biliar, neoplasias esofágicas, tales como adenocarcinoma de esófago, carcinoma de células escamosas de esófago, neoplasias gastrointestinales, neoplasias pancreáticas, tales como adenocarcinoma del páncreas, neoplasia quística mucinosa del páncreas, neoplasias quísticas pancreáticas, pancreatoblastoma, y neoplasias peritoneales), enfermedad esofágica (p. ej., enfermedades ampollas, candidiasis, acantosis glucogénica, ulceración, varices del esófago de Barrett, atresia, quistes, divertículos (p. ej., divertículo de Zenker), fístula (p. ej., fístula traqueoesofágica), trastornos de la motilidad (p. ej., síndrome CREST, trastornos de la deglución, acalasia, espasmo, reflujo gastroesofágico), neoplasias, perforación (p. ej., síndrome de Boerhaave, síndrome de Mallory-Weiss), estenosis, esofagitis, hernia diafragmática (p. ej., hernia de hiato); enfermedades gastrointestinales, tales como, gastroenteritis (p. ej., Cholera morbus, infección por virus de Norwalk), hemorragia (p. ej., hematemesis, melena, hemorragia por úlcera péptica), neoplasias del estómago (cáncer gástrico, pólipos gástricos, adenocarcinoma gástrico, cáncer de estómago), hernia (p. ej., hernia diafragmática congénita, hernia femoral, hernia inguinal, hernia obturatriz, hernia umbilical, hernia ventral), y enfermedades intestinales (p. ej., enfermedades cecales (apendicitis, neoplasias cecales)).

Quimiotaxis

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden tener actividad quimiotáctica. Una molécula quimiotáctica atrae o moviliza células (p. ej., monocitos, fibroblastos, neutrófilos, células T, mastocitos, eosinófilos, células epiteliales y/o endoteliales) a un sitio concreto del organismo, tal como un sitio de inflamación, infección, o hiperproliferación. Las células movilizadas pueden entonces combatir y/o curar el trauma o anomalía concretos.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden aumentar la actividad quimiotáctica de células concretas. Estas moléculas quimiotácticas se pueden utilizar para tratar la inflamación, infección, trastornos hiperproliferativos, o cualquier

trastorno del sistema inmunitario aumentando el número de células dirigidas a una localización particular en el organismo. Por ejemplo, las moléculas quimiotácticas se pueden utilizar para el tratamiento de heridas y otros traumatismos de los tejidos atrayendo células inmunitarias a la localización lesionada. Las moléculas quimiotácticas de la presente invención también pueden atraer fibroblastos, que se pueden utilizar para tratar heridas.

- 5 También se contempla que las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención puedan inhibir la actividad quimiotáctica. Estas moléculas también se podrían utilizar para tratar trastornos. Así, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se podrían utilizar como inhibidores de la quimiotaxis.

Actividad de unión

- 10 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser utilizadas para la detección de moléculas que se unen a la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión o para moléculas a las que se une la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión. La unión de la proteína de fusión y la molécula puede activar (agonista), aumentar, inhibir (antagonista), o disminuir la actividad de la proteína de fusión o de la molécula unida. Los ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas (p. ej., receptores), o moléculas pequeñas.

- 15 Preferiblemente, la molécula está estrechamente relacionada con el ligando natural de la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de la invención, p. ej., un fragmento del ligando, o un sustrato natural, un ligando, un mimético estructural o funcional. (Véase, Coligan et al., *Current Protocols in Immunology I* (2): Capítulo 5 (1991)). De manera similar, la molécula puede estar estrechamente relacionada con el receptor natural al que se une la porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o al menos, un fragmento del receptor susceptible de ser unido a la porción de proteína terapéutica de una proteína fusión de albúmina de la invención (p. ej., sitio activo). En cualquier caso, la molécula puede diseñarse racionalmente usando técnicas conocidas.

- 20 Preferiblemente, el escrutinio de estas moléculas implica la producción de células apropiadas que expresan las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Las células preferidas incluyen células de mamíferos, levaduras, *Drosophila*, o *E. coli*.

- El análisis puede simplemente someter a ensayo la unión de un compuesto candidato a una proteína de fusión de albúmina de la invención, en donde la unión se detecta mediante una marca, o en un ensayo que implica competición con un competidor marcado. Adicionalmente, el análisis puede someter a ensayo si el compuesto candidato da como resultado una señal generada mediante la unión a la proteína de fusión.

- 30 Alternativamente, el ensayo se puede llevar a cabo utilizando preparaciones libres de células, proteína de fusión/molécula fijada a un soporte sólido, bibliotecas químicas, o mezclas de productos naturales. El análisis también puede comprender simplemente las etapas de mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene una proteína de fusión de albúmina, medir la actividad o la unión de la proteína de fusión/molécula, y comparar la actividad o la unión de la proteína de fusión/molécula a un patrón.

- 35 Preferiblemente, un análisis ELISA puede medir el nivel o la actividad de proteína de fusión en una muestra (p. ej., muestra biológica) utilizando un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede medir el nivel o la actividad de proteína de fusión ya sea mediante unión, directa o indirectamente, a la proteína de fusión de albúmina o mediante competición con la proteína de fusión de albúmina por un sustrato.

- 40 Además, el receptor al que se une una porción de la proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención puede ser identificado mediante numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, inmunoabsorción del ligando y clasificación FACS (Coligan, et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2), Capítulo 5, (1991)). Por ejemplo, en casos en los que la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión corresponde a FGF, se puede emplear la clonación de la expresión en donde se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula sensible a la proteína de fusión de albúmina, por ejemplo, células NIH3T3 que se sabe que contienen múltiples receptores para las proteínas de la familia FGF, y células SC-3, y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en agrupaciones y se utiliza para transfectar células COS u otras células que no responden a la proteína de fusión de albúmina. Las células transfectadas que se cultivan en portaobjetos de vidrio se exponen a la proteína de fusión de albúmina de la presente invención, después de que han sido etiquetados. Las proteínas de fusión de albúmina pueden marcarse mediante una variedad de medios que incluyen yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasas específica de sitio.

- Después de la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a análisis auto-radiográfico. Se identifican las agrupaciones positivas y se preparan subagrupaciones y se vuelven a transfectar utilizando un procedimiento de sub-agrupamiento y re-escrutinio iterativo, obteniéndose finalmente un solo clon que codifica el supuesto receptor.

- 55 Como enfoque alternativo para la identificación del receptor, una proteína de fusión de albúmina marcada puede ser conectada mediante fotoafinidad a preparaciones de membrana celular o extractos que expresan la molécula del receptor para el componente de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, el

material conectado puede ser resuelto mediante análisis PAGE y expuesto a película de rayos X. El complejo marcado que contiene los receptores de la proteína de fusión se puede escindir, resolver en fragmentos de péptidos, y someter a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida de la microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para escrutar una biblioteca de ADNc para identificar los genes que codifican los supuestos receptores.

Por otra parte, se pueden emplear técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones, y/o barajado de codones (denominadas colectivamente como "barajado de ADN") para modular las actividades de la proteína de fusión, y/o la porción de proteína terapéutica o componente de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, generando de ese modo eficazmente agonistas y antagonistas de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención. Véanse, en general, las Patentes de Estados Unidos Núms. 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252, y 5.837.458, y Patten, PA, et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 (1997); Harayama, S. Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998); Hansson, DC, et al., J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999); y Lorenzo, MM y Blasco, R. Biotechniques 24(2):308-13 (1998); cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan a la presente memoria como referencia). En una realización, la alteración de los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención y por lo tanto, las proteínas de fusión de albúmina codificadas por los mismos, se puede lograr por barajado de ADN. El barajado de ADN implica el ensamblaje de dos o más segmentos de ADN en una molécula deseada por recombinación homóloga o específica de sitio. En otra realización, los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención y por lo tanto, las proteínas de fusión de albúmina codificadas por los mismos, pueden ser alterados al ser sometidos a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a error, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. En otra realización, uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención se pueden recombinar con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de una o más moléculas heterólogas. En realizaciones preferidas, las moléculas heterólogas son miembros de la familia. En otras realizaciones preferidas, la molécula heteróloga es un factor de crecimiento tal como, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), factor de crecimiento transformante (TGF) alfa, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), TGF-beta, proteína morfogenética ósea (BMP)-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, activinas A y B, decapentaplégico (dpp), 60A, OP-2, dorsalina, factores de diferenciación de crecimiento (GDF), nodal, MIS, inhibina-alfa, TGF-beta 1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta5, y factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF).

Otros fragmentos preferidos son fragmentos biológicamente activos de la porción de proteína terapéutica y/o componente de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención. Los fragmentos biológicamente activos son aquellos que exhiben actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de una porción de la proteína terapéutica y/o componente de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención. La actividad biológica de los fragmentos puede incluir una mejora de la actividad deseada, o una disminución de la actividad no deseada.

Adicionalmente, esta invención proporciona un método de escrutinio de compuestos para identificar aquellos que modulan la acción de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención. Un ejemplo de dicho análisis comprende combinar un fibroblasto de mamífero, una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, y el compuesto a escrutar y ³[H]-timidina en condiciones de cultivo celular en el que el fibroblasto normalmente proliferaría. Se puede realizar un ensayo de control en ausencia del compuesto a escrutar y en comparación con la cantidad de proliferación de fibroblastos en presencia del compuesto para determinar si el compuesto estimula la proliferación mediante la determinación de la absorción de ³[H]-timidina en cada caso. La cantidad de proliferación de fibroblastos se mide mediante cromatografía de centelleo líquido que mide la incorporación de ³[H]-timidina. Ambos compuestos agonistas y antagonistas se pueden identificar mediante este procedimiento.

En otro método, se incuban una célula de mamífero o una preparación de membrana que expresan un receptor para el componente de proteína terapéutica de una proteína de fusión de la invención con una proteína de fusión marcada de la presente invención en presencia del compuesto. La capacidad del compuesto para mejorar o bloquear esta interacción podría medirse a continuación. Alternativamente, se mide la respuesta de un sistema de segundo mensajero conocido después de la interacción de un compuesto a escrutar y el receptor y se mide la capacidad del compuesto para unirse al receptor y provocar una respuesta de segundo mensajero para determinar si el compuesto es una proteína de fusión potencial. Dichos sistemas de segundo mensajero incluyen, pero no se limitan a, AMPc, guanilato ciclasa, canales iónicos o hidrólisis de fosfoinosítidos.

Todos estos ensayos anteriores se pueden utilizar como marcadores de diagnóstico o pronóstico. Las moléculas descubiertas utilizando estos análisis pueden usarse para tratar la enfermedad o para lograr un resultado concreto en un paciente (p. ej., crecimiento de vasos sanguíneos) activando o inhibiendo la proteína de fusión/molécula. Por otra parte, los ensayos pueden descubrir agentes que pueden inhibir o potenciar la producción de las proteínas de fusión de albúmina de la invención a partir de células o tejidos manipulados adecuadamente.

Por lo tanto, la invención incluye un método para identificar compuestos que se unen a una proteína de fusión de albúmina de la invención que comprende las etapas de: (a) incubar un compuesto de unión candidato con una proteína de fusión de albúmina de la presente invención; y (b) determinar si se ha producido la unión. Por otra parte,

la invención incluye un método para identificar agonistas/antagonistas que comprende las etapas de: (a) incubar un compuesto candidato con una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, (b) analizar la actividad biológica, y (b) determinar si se ha alterado la actividad biológica de la proteína de fusión.

Suministro Dirigido

- 5 En otra realización, la invención proporciona un método para suministrar composiciones a células diana que expresan un receptor para un componente de una proteína de fusión de albúmina de la invención.

Como se comenta en la presente memoria, las proteínas de fusión de la invención pueden estar asociadas a polipéptidos heterólogos, ácidos nucleicos heterólogos, toxinas o profármacos a través de interacciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes. En una realización, la invención proporciona un método para el suministro específico de las composiciones de la invención a las células mediante la administración de proteínas de fusión de la invención (incluyendo anticuerpos) que están asociadas a polipéptidos heterólogos o ácidos nucleicos. En un ejemplo, la invención proporciona un método para suministrar una proteína terapéutica a la célula diana. En otro ejemplo, la invención proporciona un método para el suministro de un ácido nucleico de hebra sencilla (p. ej., antisentido o ribozimas) o ácido nucleico de doble hebra (p. ej., ADN que puede integrarse en el genoma de la célula o replicarse episomalmente y que se puede transcribir) a la célula diana.

En otra realización, la invención proporciona un método para la destrucción específica de células (p. ej., la destrucción de células tumorales) mediante la administración de una proteína de fusión de albúmina de la invención (p. ej., polipéptidos de la invención o anticuerpos de la invención) en asociación con toxinas o profármacos citotóxicos.

20 Por "toxina" se quieren significar compuestos que se unen y activan sistemas efectoras citotóxicos endógenos, radioisótopos, holotoxinas, toxinas modificadas, subunidades catalíticas de toxinas, o moléculas o enzimas cualesquiera no presentes normalmente en o sobre la superficie de una célula que bajo condiciones definidas causan la muerte de la célula. Las toxinas que se pueden utilizar de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos conocidos en la técnica, compuestos tales como, por ejemplo, anticuerpos (o porciones de los mismos que contienen fijación del complemento) que se unen a un sistema efector citotóxico endógeno inherente o inducido, timidina quinasa, endonucleasa, ARNasa, toxina alfa, ricina, abrina, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina de la difteria, saporina, momordina, gelonina, proteína antiviral de fitolaca, alfa-sarcina y toxina del cólera. Mediante "profármaco citotóxico" se quiere significar un compuesto no tóxico que es convertido por una enzima, normalmente presente en la célula, en un compuesto citotóxico. Los profármacos citotóxicos que se pueden utilizar de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, derivados glutamilo de agente alquilante de mostaza del ácido benzoico, derivados fosfato de etopósido o mitomicina C, arabinósido de citosina, daunorrubicina, y derivados fenoxiacetamida de doxorrubicina.

Escrutinio de fármacos

35 Adicionalmente se contempla el uso de las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención, o los polinucleótidos que codifican estas proteínas de fusión, para el escrutinio de moléculas que modifican la actividad de la proteína de fusión de albúmina de la presente invención o proteínas correspondientes a la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina. Tal método podría incluir poner en contacto la proteína de fusión con uno o varios compuestos seleccionados que se sospecha que tiene actividad antagónica o agonística, y analizando la actividad de la proteína de fusión después de la unión.

40 Esta invención es particularmente útil para el escrutinio de compuestos terapéuticos mediante el uso de las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención, o sus fragmentos de unión, en cualquiera de una variedad de técnicas de escrutinio de fármacos. La proteína de fusión de albúmina empleada en tal ensayo puede estar fijada a un soporte sólido, ser expresada sobre una superficie celular, estar libre en solución, o estar localizada intracelularmente. Un método de escrutinio de fármacos utiliza células anfitrionas eucariotas o procariotas que se transforman de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan la proteína de fusión de albúmina. Los fármacos se escrutan contra tales células transformadas o sobrenadantes obtenidos a partir del cultivo de tales células, en análisis de unión competitiva. Se puede medir, por ejemplo, la formulación de complejos entre el agente que se está sometiendo a ensayo y una proteína de fusión de albúmina de la presente invención.

50 Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos de escrutinio de fármacos o cualquier otro agente que afectan a las actividades mediadas por las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención. Estos métodos comprenden poner en contacto tal agente con una proteína de fusión de albúmina de la presente invención o un fragmento de la misma y analizar la presencia de un complejo entre el agente y la proteína de fusión de albúmina o un fragmento de la misma, mediante métodos bien conocidos en la técnica. En tal análisis de unión competitiva, los agentes para el escrutinio suelen estar etiquetados. Después de la incubación, el agente libre se separa del presente en forma unida, y la cantidad de marca libre o no complejada es una medida de la capacidad de un agente concreto para unirse a la proteína de fusión de albúmina de la presente invención.

Otra técnica para el escrutinio de fármacos proporciona el escrutinio de alto rendimiento para compuestos que tienen afinidad de unión adecuada a una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, y se describe en gran

detalle en la Solicitud de Patente Europea 84/03564, publicada el 13 de Septiembre de 1984, que se incorpora a la presente memoria como referencia. En pocas palabras, un gran número de diferentes compuestos de ensayo peptídicos pequeños se sintetizan sobre un sustrato sólido, tal como alfileres de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo peptídicos se hacen reaccionar con una proteína de fusión de albúmina de la presente invención y se lavan. Los péptidos unidos son detectados por métodos bien conocidos en la técnica. La proteína de fusión de albúmina purificada puede ser aplicada como revestimiento directamente sobre placas para su uso en las técnicas de escrutinio de fármacos anteriormente mencionadas. Además, se pueden utilizar anticuerpos no neutralizadores para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.

Esta invención también contempla el uso de análisis de escrutinio de fármacos competitivos en los que anticuerpos neutralizadores capaces de unirse a una proteína de fusión de albúmina de la presente invención compiten específicamente con un compuesto de ensayo por la unión a la proteína de fusión de albúmina o fragmentos de la misma. De esta manera, los anticuerpos se utilizan para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más epítomos antígenicos con una proteína de fusión de albúmina de la invención.

Péptidos de Unión y otras Moléculas

La invención también abarca procedimientos de escrutinio para identificar polipéptidos y no polipéptidos que se unen a las proteínas de fusión de albúmina de la invención, y las moléculas de unión identificadas de este modo. Estas moléculas de unión son útiles, por ejemplo, como agonistas y antagonistas de las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Tales agonistas y antagonistas se pueden utilizar, de acuerdo con la invención, en las realizaciones terapéuticas descritas en detalle, a continuación.

Este método comprende las etapas de: poner en contacto una proteína de fusión de albúmina de la invención con una pluralidad de moléculas; e identificar una molécula que se une a la proteína de fusión de albúmina.

La etapa de poner en contacto la proteína de fusión de albúmina de la invención con la pluralidad de moléculas se puede efectuar de diversas maneras. Por ejemplo, se puede contemplar la inmovilización de la proteína de fusión de albúmina sobre un soporte sólido y poner en contacto una solución de la pluralidad de moléculas con los polipéptidos inmovilizados. Tal procedimiento sería similar a un procedimiento de cromatografía de afinidad, comprendiendo la matriz de afinidad la proteína de fusión de albúmina inmovilizada de la invención. Las moléculas que tienen una afinidad selectiva por la proteína de fusión de albúmina se pueden purificar a continuación mediante selección de afinidad. La naturaleza del soporte sólido, el procedimiento para el anclaje de la proteína de fusión de albúmina al soporte sólido, el disolvente y las condiciones de la aislamiento por afinidad o selección son en gran parte convencionales y bien conocidos por los expertos normales en la técnica.

Alternativamente, se puede también separar una pluralidad de polipéptidos en fracciones sustancialmente separadas que comprenden un subconjunto de polipéptidos individuales. Por ejemplo, se puede separar la pluralidad de polipéptidos mediante electroforesis en gel, cromatografía en columna, o un método conocido por los expertos normales en la técnica para la separación de polipéptidos. Los polipéptidos individuales también pueden ser producidos por una célula anfitriona transformada de tal manera que tal que se expresen en o aproximadamente en su superficie exterior (p. ej., un fago recombinante). Los productos aislados individuales a continuación, pueden ser "sondeados" con una proteína de fusión de albúmina de la invención, opcionalmente en presencia de un inductor que debe ser uno necesario para la expresión, para determinar si tiene lugar cualquier interacción de afinidad selectiva entre la proteína de fusión de albúmina y el clon individual. Antes de poner en contacto la proteína de fusión de albúmina con cada fracción que comprende polipéptidos individuales, los polipéptidos podrían en primer lugar transferirse a un soporte sólido para mayor comodidad. Tal soporte sólido puede ser simplemente un trozo de membrana de filtro, tal como una elaborada de nitrocelulosa o nailon. De esta manera, los clones positivos pueden ser identificados a partir de una colección de células anfitrionas transformadas de una biblioteca de expresión, que albergan un constructo de ADN que codifica un polipéptido que tiene una afinidad selectiva por una proteína de fusión de albúmina de la invención. Además, la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene una afinidad selectiva por una proteína de fusión de albúmina de la invención puede ser determinada directamente por medios convencionales o la secuencia codificante de ADN que codifica el polipéptido con frecuencia puede ser determinada con mayor comodidad. La secuencia primaria puede deducirse a continuación a partir de la secuencia de ADN correspondiente. Si la secuencia de aminoácidos se va a determinar a partir del propio polipéptido, se pueden utilizar técnicas de microsecuenciación. La técnica de secuenciación puede incluir espectroscopia de masas.

En ciertas situaciones, puede ser deseable separar mediante lavado cualquier polipéptido no unidos de una mezcla de una proteína de fusión de albúmina de la invención y la pluralidad de polipéptidos antes de tratar de determinar o detectar la presencia de una interacción de afinidad selectiva. Tal etapa de lavado puede ser particularmente deseable cuando la proteína de fusión de albúmina de la invención o la pluralidad de polipéptidos están unidos a un soporte sólido.

La pluralidad de moléculas proporcionadas de acuerdo con este método se puede proporcionar por medio de bibliotecas de diversidad, como bibliotecas peptídicas o no peptídicas aleatorias o combinatorias que pueden ser escrutadas para determinar moléculas que se unen específicamente a una proteína de fusión de albúmina de la invención. Muchas bibliotecas son conocidas en la técnica que se puede utilizar, p. ej., bibliotecas sintetizadas

- químicamente, recombinantes (p. ej., bibliotecas de presentación en fagos), y bibliotecas basadas en traducción in vitro. Los ejemplos de bibliotecas sintetizadas químicamente son descritas por Fodor et al., en *Science* 251:767-773 (1991); Houghten et al., *Nature* 354:84-86 (1991); Lam et al., *Nature* 354:82-84 (1991); Medynski, *Bio/Technology* 12:709-710 (1994); Gallop et al., *J. Medicinal Chemistry* 37(9):1233-1251 (1994); Ohlmeyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:10922-10926 (1993); Erb et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11422-11426 (1994); Houghten et al., *Biotechniques* 13:412 (1992); Jayawickreme et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:1614-1618 (1994); Salmon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:11708-11712 (1993); Publicación PCT Núm. WO 93/20242; y Brenner y Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:5381-5383 (1992).
- Los ejemplos de bibliotecas de presentación de fagos son descritos por Scott et al., en *Science* 249: 386-390 (1990); Devlin et al., *Science*, 249:404-406 (1990); Christian et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227:711-718 (1992); Lenstra, J. *Immunol. Meth.* 152:149-157 (1992); Kay et al., *Gene* 128:59-65 (1993); y la Publicación PCT Núm. WO 94/18318 de fecha 18 de Agosto de 1994.
- Las bibliotecas basadas en traducción in vitro incluyen pero no se limitan a las descritas en la Publicación PCT Núm. WO 91/05058 de fecha 18 de Abril 1991; y Mattheakis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:9022-9026 (1994).
- A modo de ejemplos de bibliotecas no peptídicas, se puede adaptar para su uso una biblioteca de benzodiazepina (véase p. ej., Bunin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4.708-4712 (1994)). También se pueden utilizar bibliotecas de peptoides (Simon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:9367-9371 (1992)). Otro ejemplo de una biblioteca que se puede utilizar, en la que las funcionalidades amida en los péptidos se han permitilado para generar una biblioteca combinatoria transformada químicamente, es descrito por Ostresh et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11138-11142 (1994)).
- La variedad de bibliotecas no peptídicas que son útiles en la presente invención es grande. Por ejemplo, Ecker y Crooke (*Bio/Technology* 13:351-360 (1995)) enumeran benzodiazepinas, hidantoínas, piperazinodionas, bifenilos, análogos de azúcares, beta-mercaptocetonas, ácidos arilacéticos, acilpiperidinas, benzopiranos, cubanos, xantinas, aminimidas, y oxazolonas entre las especies químicas que forman la base de varias bibliotecas.
- Las bibliotecas no peptídicas se pueden clasificar en dos tipos: monómeros y oligómeros decorados. Las bibliotecas de monómero decorados emplean una estructura de armazón relativamente simple en la que se añade una variedad de grupos funcionales. A menudo, el armazón será una molécula con una actividad farmacológica útil conocida. Por ejemplo, el armazón podría ser la estructura de la benzodiazepina.
- Las bibliotecas de oligómeros no peptídicos utilizan un gran número de monómeros que se ensamblan entre sí de manera que se crean nuevas formas que dependen del orden de los monómeros. Entre las unidades monoméricas que se han utilizado se encuentran los carbamatos, las pirrolinonas y las morfollinas. Los peptoides, oligómeros similares a péptidos en los que la cadena lateral está anclada al grupo amino alfa en lugar de al carbono alfa, forman la base de otra versión de las bibliotecas de oligómeros no peptídicos. Las primeras bibliotecas de oligómeros no peptídicos utilizaban un solo tipo de monómero y de este modo contenían una cadena principal de repetición. Las bibliotecas recientes han utilizado más de un monómero, confiriendo a las bibliotecas de flexibilidad añadida.
- El escrutinio de las bibliotecas se puede lograr por cualquiera de una variedad de métodos comúnmente conocidos. Véanse, p. ej., las siguientes referencias, que describen el escrutinio de bibliotecas de péptidos: Parmley et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 251:215-218 (1989); Scott et al., *Science* 249:386-390 (1990); Fowlkes et al., *BioTechniques* 13:422-427 (1992); Oldenburg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:5393-5397 (1992); Yu et al., *Cell* 76:933-945 (1994); Staudt et al., *Science* 241:577-580 (1988); Bock et al., *Nature* 355:564-566 (1992); Tuerk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 6988-6992 (1992); Ellington et al., *Nature* 355:850-852 (1992); Patente de Estados Unidos. Núm. 5.096.815, Patente de los Estados Unidos. Núm. 5.223.409, y Patente de los Estados Unidos. Núm. 5.198.346, todas de Ladner et al.; Rebar et al., *Science* 263:671-673 (1993); y Publicación PCT Núm. WO 94/18318.
- En una realización específica, el escrutinio para identificar una molécula que se une a una proteína de fusión de albúmina de la invención puede llevarse a cabo poniendo en contacto los miembros de la biblioteca con una proteína de fusión de albúmina de la invención inmovilizada sobre una fase sólida y cosechar los miembros de la biblioteca que se une a la proteína de fusión de albúmina. Los ejemplos de tales métodos de escrutinio, denominados técnicas de "inmunoabsorción" son descritas a modo de ejemplo por Parmley et al., *Gene* 73:305-318 (1988); Fowlkes et al., *BioTechniques* 13:422-427 (1992); Publicación PCT Núm. WO 94/18318; y en las referencias citadas en la presente memoria.
- En otra realización, se puede utilizar el sistema de dos híbridos para seleccionar proteínas que interactúan en levadura (Fields y otros, *Nature* 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:9578-9582 (1991)) para identificar moléculas que se unen específicamente a polipéptidos de la invención.
- Cuando la molécula de unión es un polipéptido, el polipéptido puede ser convenientemente seleccionado de cualquier biblioteca de péptidos, incluyendo bibliotecas de péptidos al azar, bibliotecas combinatorias de péptidos, o bibliotecas sesgadas de péptidos. El término "sesgada" se utiliza en la presente memoria para significar que el método de generación de la biblioteca se manipula con el fin de limitar uno o más parámetros que rigen la diversidad de la colección de moléculas resultante, en este caso péptidos.

De este modo, una biblioteca de péptidos verdaderamente aleatoria generaría una colección de péptidos en la que la probabilidad de encontrar un aminoácido concreto en una posición dada del péptido es la misma para los 20 aminoácidos. Se puede introducir un sesgo en la biblioteca, sin embargo, especificando, por ejemplo, que se produce una lisina cada quinto aminoácido o que se fijan las posiciones 4, 8, y 9 de una biblioteca de decapeptidos para incluir solamente arginina. Claramente, se pueden contemplar muchos tipos de sesgos, y la presente invención no se limita a ningún sesgo concreto. Además, la presente invención contempla tipos específicos de bibliotecas de péptidos, tales como bibliotecas de péptidos presentadas por fagos y las que utilizan un constructo de ADN que comprende un vector de fago lambda con un inserto de ADN.

Como se mencionó anteriormente, en el caso de una molécula de unión que es un polipéptido, el polipéptido puede tener de aproximadamente 6 a menos de aproximadamente 60 residuos de aminoácido, preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 residuos de aminoácido, y lo más preferiblemente, de aproximadamente 6 a aproximadamente 22 aminoácidos. En otra realización, un polipéptido de unión está en el intervalo de 15-100 aminoácidos, o 20-50 aminoácidos.

El polipéptido de unión seleccionado se puede obtener mediante síntesis química o expresión recombinante.

Otras Actividades

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención, se pueden emplear en el tratamiento para estimular la revascularización de tejidos isquémicos debido a diversas enfermedades tales como trombosis, arteriosclerosis, y otras afecciones cardiovasculares. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden emplearse para estimular la angiogénesis y la regeneración de miembros, como se comentó anteriormente.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también se pueden emplear para tratar heridas debidas a lesiones, quemaduras, reparación de tejido después de operación, y las úlceras ya que son mitogénicos para varias células de diferentes orígenes, tales como fibroblastos y células del músculo esquelético, y por lo tanto, facilitan la reparación o sustitución de tejido dañado o enfermo.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también se pueden emplear para estimular el crecimiento neuronal y para tratar y prevenir el daño neuronal que se produce en ciertos trastornos neuronales o afecciones neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad, la enfermedad de Parkinson, y el complejo relacionado con el SIDA. Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención puede tener la capacidad de estimular el crecimiento de condrocitos, por lo tanto, se pueden emplear para mejorar la regeneración ósea y periodontal y ayudar en el trasplante de tejidos o injertos óseos.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también se pueden emplear para prevenir el envejecimiento cutáneo debido a quemaduras solares mediante la estimulación de crecimiento de queratinocitos.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también se pueden emplear para la prevención de la pérdida del cabello. En la misma línea, una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden emplear para estimular el crecimiento y la diferenciación de células hematopoyéticas y células de médula ósea cuando se utilizan combinados con otras citoquinas.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también se pueden emplear para mantener órganos antes del trasplante o para apoyar el cultivo de células de tejidos primarios. Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también se pueden emplear para la inducción de tejido de origen mesodérmico para su diferenciación en embriones tempranos.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de albúmina de fusión de la invención también puede aumentar o disminuir la diferenciación o proliferación de células madre embrionarias, aparte de, como se comentó anteriormente, el linaje hematopoyético.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también se pueden utilizar para modular características de mamíferos, tales como la altura del cuerpo, peso, color de pelo, color de los ojos, piel, porcentaje de tejido adiposo, pigmentación, tamaño y forma (p. ej., cirugía estética). Del mismo modo, una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden utilizar para modular el metabolismo de mamíferos que afecta al catabolismo, anabolismo, procesamiento, utilización y almacenamiento de energía.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de

albúmina de la invención se puede utilizar para cambiar el estado mental o el estado físico de un mamífero influyendo en los biorritmos, los ritmos circadianos, la depresión (incluyendo trastornos depresivos), la tendencia a la violencia, la tolerancia al dolor, las capacidades reproductivas (preferiblemente mediante actividad de tipo Activina o Inhibina), los niveles hormonales o endocrinos, el apetito, la libido, la memoria, el estrés u otras cualidades cognitivas.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también se pueden utilizar como aditivo alimentario o conservante, por ejemplo para aumentar o disminuir las capacidades de almacenamiento, el contenido de grasa, los lípidos, las proteínas, los carbohidratos, las vitaminas, los minerales, los cofactores u otros componentes nutricionales.

Las aplicaciones anteriormente citadas tienen usos en una amplia variedad de anfitriones. Tales anfitriones incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, muridos, conejos, cabras, cobayas, camellos, caballos, ratones, ratas, hámster, cerdos, micro-cerdos, pollos, cabras, vacas, ovejas, perros, gatos, primates no humanos, y humanos. En realizaciones específicas, el anfitrión es un ratón, conejo, cabra, cobaya, pollo, rata, hámster, cerdo, oveja, perro o gato. En realizaciones preferidas, el anfitrión es un mamífero. En realizaciones más preferidas, el anfitrión es un ser humano.

Habiendo descrito generalmente la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretende que sean limitantes.

Sin descripción adicional, se cree que un experto normal en la técnica puede, utilizando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, llevar a cabo y utilizar las alteraciones detectadas en la presente invención y poner en práctica los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo por lo tanto, apuntan específicamente a realizaciones preferidas de la presente invención, y no se deben interpretar como limitantes el resto de la descripción de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de pScNHSA y pScCHSA.

Los vectores pScNHSA (Núm. de depósito ATCC PTA-3279) y pScCHSA (Núm. de depósito ATCC PTA-3276) están derivados de pPPC0005 (Núm. de depósito ATCC PTA-3278) y se utilizan como vectores de clonación en los que los polinucleótidos que codifican una proteína terapéutica o un fragmento o variante de la misma se insertan adyacentes a y en marco de traducción con los polinucleótidos que codifican la albúmina de suero humana "HSA". El pScCHSA se puede utilizar para la generación de fusiones de proteína terapéutica-HSA, mientras que pScNHSA se puede utilizar para generar fusiones de HSA-proteína terapéutica.

Generación de pScCHSA: fusión de albúmina con el radical de albúmina C-terminal con respecto a la porción terapéutica.

Se preparó un vector para facilitar la clonación de ADN que codifica una proteína terapéutica N-terminal a ADN que codifica la proteína de la albúmina madura mediante la alteración de la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal de HSA quimérico en pPPC0005 para incluir los sitios de restricción *Xho* I y *Cla* I.

En primer lugar, se eliminaron los sitios *Xho* I y *Cla* I inherentes a pPPC0005 (localizados 3' de la secuencia terminadora de ADHL) mediante digestión de pPPC0005 con *Xho* I y *Cla* I, rellenando los extremos cohesivos con ADN polimerasa de T4, y religando los extremos romos para crear pPPC0006.

En segundo lugar, los sitios de restricción *Xho* I y *Cla* I fueron diseñados en la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal de HSA (una quimera del líder de HSA y un sitio KEX2 del factor alfa de apareamiento, "MAF") en pPPC0006 utilizando dos rondas de PCR. En la primera ronda de PCR, se llevó a cabo la amplificación con los cebadores que se muestran como SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37. El cebador cuya secuencia se muestra como SEQ ID NO: 36 comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica parte de la secuencia del péptido señal de HSA, un sitio *kex2* de la secuencia líder del factor de apareamiento alfa, y parte del extremo amino de la forma madura de HSA. Se introdujeron cuatro mutaciones puntuales en la secuencia, creando los sitios *Xho* I y *Cla* I que se encuentran en el empalme del péptido señal quimérico y la forma madura de la HSA. Estas cuatro mutaciones están subrayadas en la secuencia mostrada a continuación. En pPPC0005 los nucleótidos en estas cuatro posiciones de 5' a 3' son T, G, T, y G.

5'-GCCTCGAGAAAAGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGATTTAAAGATTTGGG-3' (SEQ ID NO: 36) y 5'-AATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCTCTTTCTCGAGGCTCCTGGAATAAGC-3' (SEQ ID NO: 37). A continuación, se realizó una segunda ronda de PCR con un cebador flanqueante corriente arriba, 5'-TACAACTTAAGAGTCCAATTAGC-3' (SEQ ID NO: 38) y un cebador flanqueante 5' aguas abajo CACTTCTCTAGAGTGGTTTCATATGTCTT-3' (SEQ ID NO: 39). El producto de PCR resultante se purificó y se digirió con *Afl* II y *Xba* I y se ligó en los mismos sitios en pPPC0006 creando pScCHSA. El plásmido resultante tiene sitios *Xho* I y *Cla* I modificados genéticamente en la secuencia señal. La presencia del sitio *Xho* I crea un único cambio de aminoácido en el extremo de la secuencia señal de LDKR para LEKR. El cambio de D a E no estará presente en el plásmido de expresión de la proteína de fusión de albúmina final cuando se liga una secuencia de

ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica la porción terapéutica de la proteína de fusión de albúmina con un sitio *Sal* I 5' (que es compatible con el sitio *Xho* I) y un sitio *Cla* I 3' a los sitios *Xho* I y *Cla* I de pScCHSA. La ligación de *Sal* I a *Xho* I restaura la secuencia de aminoácidos original de la secuencia del péptido señal. El ADN que codifica la porción terapéutica de la proteína de fusión de albúmina se puede insertar después del sitio Kex2 (Kex2 escinde después de la secuencia de aminoácidos dibásica de KR en el extremo del péptido señal) y antes del sitio *Cla* I.

Generación de pScNHSA: fusión de albúmina con el radical de albúmina de N-terminal a la porción terapéutica

Se preparó un vector para facilitar la clonación de ADN que codifica una porción de proteína terapéutica C-terminal a ADN que codifica la proteína de la albúmina madura, mediante la adición de tres sitios de restricción de ocho pares de bases a pScCHSA. Los sitios de restricción *Asc* I, *Fse* I, y *Pme* I se añadieron entre los sitios *Bsu*36 I y *Hind* III al extremo de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína HSA madura. Esto se logró mediante el uso de dos cebadores sintéticos complementarios que contenían los sitios de restricción *Asc* I, *Fse* I, y *Pme* I subrayados (SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41).

5'-AAGCTGCCTTAGGCTTATAATAAGGCGCGCCGGCGCGCGTTTAACTAAGCTTAATTCT-3' (SEQ ID NO: 40) y 5'-AGAATTAAGCTTAGTTTAAACGGCGCGCCGGCGCGCGCTTATTATAAGCCTAAGGCAGCTT-3' (SEQ ID NO: 41). Estos cebadores se hibridaron y se digirieron con *Bsu*36 I y *Hind* III y se ligaron en los mismos sitios en pScCHSA creando pScNHSA.

Ejemplo 2: Generación del constructo general para la transformación de levaduras

Los vectores pScNHSA y pScCHSA pueden ser utilizados como vectores de clonación en los que los polinucleótidos que codifican una proteína terapéutica o un fragmento o variante de la misma se insertan adyacentes a polinucleótidos que codifican albúmina de suero humana madura "HSA". El pScCHSA se utiliza para la generación de fusiones de proteína terapéutica-HSA, mientras que el pScNHSA se puede utilizar para generar fusiones de HSA-proteína terapéutica.

Generación de constructos de fusión de albúmina que comprenden productos de fusión de HSA-proteína terapéutica.

El ADN que codifica una proteína terapéutica (p. ej., las secuencias mostradas en SEQ ID NO: X o conocidas en la técnica) puede ser amplificado mediante PCR utilizando los cebadores que facilitan la generación de un constructo de fusión (p. ej., mediante la adición de sitios de restricción, fusiones continuas codificantes, secuencias conectoras codificantes, etc.) Por ejemplo, un experto en la técnica podría diseñar un cebador 5' que añade polinucleótidos que codifican los últimos cuatro aminoácidos de la forma madura de HSA (y que contiene el sitio *Bsu*36I) en el extremo 5' del ADN que codifica una proteína terapéutica; y un cebador 3' que añade un codón de PARADA y sitios de clonación apropiados en el extremo 3' de la secuencia codificante de la proteína terapéutica. Por ejemplo, el cebador directo utilizado para amplificar el ADN que codifica una proteína terapéutica puede tener la secuencia, 5'-aagctGCCTTAGGCTTA(N)₁₅-3' (SEQ ID NO: 42) donde la secuencia subrayada es un sitio *Bsu*36I, los nucleótidos en mayúscula codifican los últimos cuatro aminoácidos de la proteína madura de HSA (ALGL), y (N)₁₅ es idéntico a los primeros 15 nucleótidos que codifican la proteína terapéutica de interés. Del mismo modo, el cebador inverso utilizado para amplificar el ADN que codifica una proteína terapéutica puede tener la secuencia, 5'-GCGCGCCTTTAAACGGCGCGCCGGCGCGCCTTATTA(N)₁₅-3' (SEQ ID NO: 43), donde la secuencia en cursiva es un sitio *Pme* I, la secuencia subrayada doble es un sitio *Fse* I, la secuencia subrayada individualmente es un sitio *Asc* I, los nucleótidos en el recuadro son el complemento inverso de dos codones de parada en tándem, y (N)₁₅ es idéntico al complemento inverso de los últimos 15 nucleótidos que codifican la proteína de interés terapéutico. Una vez que el producto de la PCR se amplifica se puede cortar con *Bsu*36I y ligar uno de (*Asc* I, *Fse* I, o *Pme* I) a pScNHSA.

La presencia del sitio *Xho* I en la secuencia líder quimérica de HSA crea un único cambio de aminoácido en el extremo de la secuencia señal quimérica, es decir, la secuencia señal de HSA-kex2, de LDKR (SEQ ID NO: 44) a LEKR (SEQ ID NO: 45).

Generación del constructo de fusión de albúmina que comprende productos de fusión de genes de HSA.

Al igual que en el método descrito anteriormente, el ADN que codifica una proteína terapéutica puede ser amplificado mediante PCR utilizando los siguientes cebadores: un cebador 5' que añade polinucleótidos que contiene un sitio *Sall* y que codifica los tres últimos aminoácidos de la secuencia líder de HSA, DKR, en el extremo 5' del ADN que codifica una proteína terapéutica; y un cebador que añade los polinucleótidos que codifican los primeros aminoácidos de la HSA madura que contiene un sitio *Cla* I en el extremo 3' del ADN que codifica una proteína terapéutica. Por ejemplo, el cebador efector se utiliza para amplificar el ADN que codifica una proteína terapéutica puede tener la secuencia, 5'-aggagcgtcGACAAAAGA(N)₁₅-3' (SEQ ID NO: 46) donde la secuencia subrayada es un sitio *Sal* I, los nucleótidos en mayúsculas codifican los tres últimos aminoácidos de la secuencia líder de HSA (DKR), y (N)₁₅ es idéntico a los primeros 15 nucleótidos que codifican la proteína terapéutica de interés. Del mismo modo, el cebador inverso utilizado para amplificar el ADN que codifica una proteína terapéutica puede

tener la secuencia, 5'-CTTTAAATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATC(N)₁₅-3' (SEQ ID NO: 47), donde la secuencia en cursiva es un sitio *Cla* I, los nucleótidos subrayados son el complemento inverso del ADN que codifica los primeros 9 aminoácidos de la forma madura de HSA (DAHKSEVAH, SEQ ID NO: 48), y (N)₁₅ es idéntico al complemento inverso de los últimos 15 nucleótidos que codifican la proteína terapéutica de interés. Una vez que el producto de la PCR se amplifica puede ser cortado con *Sa*I y *Cla* I y ligado a pScCHSA digerido con *Xho* I y *Cla* I. Se puede desear una secuencia señal o líder diferente, por ejemplo, se pueden subclonar invertasa "INV" (Acceso de Swiss-Prot P00724), factor alfa de apareamiento "MAF" (Acceso de Genbank AAA18405), MPIF (Geneseq AAF82936), Fibulina B (Acceso de Swiss-Prot P23142), clusterina (Acceso de Swiss-Prot P10909), Proteína 4 de Unión al Factor de Crecimiento Similar a Insulina (Acceso de Swiss-Prot P22692), y permutaciones de la secuencia líder de HSA en el vector apropiado por medio de métodos convencionales conocidos en la técnica.

Generación de constructo de fusión de albúmina compatible para la expresión en la levadura *S. cerevisiae*.

El fragmento Not I que contiene el ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina de N-terminal o C-terminal generada a partir de pScNHSA o pScCHSA se puede clonar a continuación en el sitio Not I de pSAC35 que tiene un marcador de selección LEU2. El vector resultante se utiliza después en la transformación de un sistema de expresión de levadura de *S. cerevisiae*.

Ejemplo 3: Expresión general en la levadura *S. cerevisiae*.

Un vector de expresión compatible con la expresión en levaduras se puede transformar en la levadura *S. cerevisiae* mediante transformación con acetato de litio, electroporación, u otros métodos conocidos en la técnica y/o como describen o en parte, Sambrook, Fritsch, y Maniatis. 1989. en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a edición", volúmenes 1-3, y en Ausubel et al. 2000. Hospital General de Massachusetts y la Escuela Médica de Harvard "Current Protocols in Molecular Biology", volúmenes 1-4. Los vectores de expresión se introducen en cepas de *S. cerevisiae* DXY1, D88, o BXP10 mediante transformación, los transformantes individuales se pueden cultivar, por ejemplo, durante 3 días a 30°C en 10 mL de YEPD (extracto de levadura al 1% p/v, peptona al 2 % p/v, dextrosa al 2% p/v), y las células se pueden recoger en la fase estacionaria después de 60 horas de crecimiento. Los sobrenadantes se recogen aclarando las células a 3.000 g durante 10 minutos.

El pSAC35 (Sleep et al., 1990, Biotechnology 8:42 y véase la figura 3) comprende, además del marcador seleccionable LEU2, el plásmido de 2 µm de levadura completo para proporcionar las funciones de replicación, el promotor PRB1, y la señal de terminación de ADH1.

Ejemplo 4: Purificación general de una proteína de fusión de albúmina expresada a partir de una fusión de albúmina en la levadura *S. cerevisiae*.

En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden la forma madura de HSA fusionada a cualquiera de los extremos N- o C-terminales de la forma madura de una proteína terapéutica o porciones de la misma (p. ej., la forma madura de una proteína terapéutica enumerada en la Tabla 1, o la forma madura de una proteína terapéutica mostrada en la Tabla 2 como SEQ ID NO: Z). En una realización de la invención, las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden adicionalmente una secuencia señal que dirige el polipéptido de fusión naciente en las rutas de secreción del anfitrión utilizado para la expresión. En una realización preferida, el péptido señal codificado por la secuencia de señal se retira, y la proteína de fusión de albúmina madura se secreta directamente al medio de cultivo. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden preferiblemente secuencias señal heterólogas (p. ej., la secuencia señal no nativa de una proteína terapéutica concreta), incluyendo, pero no limitadas a, MAF, INV, Ig, Fibulina B, Clusterina, Proteína 4 de Unión al Factor de Crecimiento Similar a la Insulina, secuencias líder de HSA variantes, incluyendo, pero no limitadas a, una secuencia líder de HSA/MAF quimérica, u otras secuencias señal heterólogas conocidas en la técnica. Son especialmente preferidas las secuencias señal enumeradas en la Tabla 2 y/o la secuencia señal enumerada en la sección de "Expresión de Proteínas de Fusión" y/o "Métodos Adicionales de Producción Recombinante y Sintética de Proteínas de Fusión de Albúmina" de la memoria descriptiva anterior. En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de la invención comprenden adicionalmente un residuo de metionina N-terminal. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, incluyendo fragmentos y/o variantes, también están abarcados por la invención.

Las proteínas de fusión de albúmina expresadas en levadura como se ha descrito anteriormente se pueden purificar a pequeña escala a través de una columna de afinidad de péptido Dyax como sigue. Los sobrenadantes de levadura que expresan una proteína de fusión de albúmina se someten a diafiltración frente a tampón de fosfato 3 mM de pH 6,2, NaCl 20 mM y Tween 20 al 0,01% para reducir el volumen y para eliminar los pigmentos. La solución se filtra a continuación a través de un dispositivo de 0.22 µm. El producto filtrado se carga en una columna de afinidad de péptido Dyax. La columna se eluye con Tris/HCl 100 mM, tampón de pH 8,2. Las fracciones del pico que contienen la proteína se recogen y se analizan en SDS-PAGE después de concentrar 5 veces.

Para la purificación a gran escala, se puede utilizar el siguiente método. El sobrenadante en exceso de 2 L se somete a diafiltración y se concentra hasta 500 mL en Tris/HCl 20 mM pH 8,0. La solución de proteína concentrada se carga en una columna de Flujo Rápido de DEAE-Sefarosa de 50 mL pre-equilibrada, la columna se lava, y la proteína se hace eluir con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,4 M en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0. Las

fracciones que contenían la proteína se reúnen, se ajustan a pH 6,8 con fosfato de sodio (NaH_2PO_4) 0,5 M. Se añade una concentración final 0,9 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a la solución de proteína y toda la solución se carga en una columna Butyl650S de 50 mL pre-equilibrada. La proteína se eluye con un gradiente lineal de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,9 a 0 M). Las fracciones con la fusión de albúmina se agrupan de nuevo, se someten a diafiltración frente a tampón de Na_2HPO_4 /ácido cítrico 10 mM de pH 5,75, y se cargan en una columna de Flujo Rápido de SP-Sefarosa pre-equilibrada de 50 mL. La proteína se eluye con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,5 M. Las fracciones que contienen la proteína de interés se combinan, el tampón se cambia a Na_2HPO_4 /ácido cítrico 10 mM de pH 6,25 con un concentrador Amicon, la conductividad es $< 2,5$ mS/cm. Esta solución de proteína se carga en una columna de alto rendimiento de Q-Sefarosa pre-equilibrada de 15 mL, la columna se lava, y la proteína se eluye con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,15 M. La proteína purificada se puede formular a continuación en una composición del tampón específica mediante intercambio de tampón.

Ejemplo 5: Generación de constructo general para la transfección de células de mamífero.

Generación de constructo de fusión de albúmina compatible para su expresión en líneas celulares de mamíferos.

Los constructos de fusión de albúmina pueden ser generados en vectores de expresión para su uso en sistemas de cultivo de células de mamíferos. El ADN que codifica una proteína terapéutica se puede clonar en el extremo N o el extremo C a HSA en un vector de expresión de mamífero por medio de métodos convencionales conocidos en la técnica (p. ej., amplificación mediante PCR, digestión de restricción y ligación). Una vez que se ha construido el vector de expresión, puede proseguir la transfección en un sistema de expresión de mamífero. Los vectores adecuados son conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, por ejemplo, el vector pC4, y/o vectores disponibles de Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH).

El ADN que codifica la albúmina de suero humana se ha clonado en el vector pC4 que es adecuado para sistemas de cultivo de mamíferos, creando el plásmido pC4:HSA (Núm. de Depósito de la ATCC PTA 3277). Este vector tiene un gen de la dihidrofolato reductasa, "DHFR", que va a permitir la selección en presencia de metotrexato.

El vector pC4:HSA es adecuado para la expresión de proteínas de fusión de albúmina en células CHO. Para su expresión, en otros sistemas de cultivo de células de mamífero, puede ser deseable subclonar un fragmento que comprende, o consiste alternativamente en, ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina en un vector de expresión alternativo. Por ejemplo, un fragmento que comprende, o consiste alternativamente en, ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina madura puede subclonarse en otro vector de expresión que incluye, pero no está limitado a, cualquiera de los vectores de expresión de mamíferos descritos en la presente memoria.

En una realización preferida, el ADN que codifica un constructo de fusión de albúmina se subclona en vectores proporcionados por Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH) mediante procedimientos conocidos en la técnica para la expresión en células NSO.

Generación de constructos de fusión de albúmina que comprenden productos de fusión de HSA-proteína terapéutica

Utilizando pC4:HSA (Núm. de depósito de la ATCC PTA-3277), se pueden generar constructos de fusión de albúmina en los que la porción de proteína terapéutica es terminal C con respecto a la secuencia de la albúmina madura. Por ejemplo, se puede clonar el ADN que codifica una proteína terapéutica o fragmento o variante de la misma entre los sitios de restricción *Bsu* 361 y *Asc* I del vector. Cuando se clona en *Bsu* 361 y *Asc* I, se puede emplear el mismo diseño de cebador utilizado para la clonación en el sistema de vector de levadura (SEQ ID NO: 42 y 43) (véase el Ejemplo 2).

Generación de constructos de fusión de albúmina que comprenden productos de fusión de genes de HSA.

Utilizando pC4:HSA (Núm. de depósito de la ATCC PTA-3277), se pueden generar constructos de fusión de albúmina en los que una porción de la proteína terapéutica se clona N-terminal con respecto a la secuencia de la albúmina madura. Por ejemplo, se puede clonar el ADN que codifica una proteína terapéutica que tiene su propia secuencia señal entre los sitios *Bam* HI (o *Hind* III) y *Cla* I de pC4:HSA. Cuando la clonación es en el sitio *Bam* HI o *Hind* III, es preferible incluir una secuencia de Kozak (CCGCCACCATG, SEQ ID NO: 49) antes del codón de inicio de la traducción del ADN que codifica la proteína terapéutica. Si una proteína terapéutica no tiene una secuencia señal, el ADN que codifica esa proteína terapéutica puede ser clonado entre los sitios *Xho* I y *Cla* I de pC4:HSA. Cuando se utiliza el sitio *Xho* I, se pueden utilizar los siguientes cebadores de PCR 5' (SEQ ID NO: 50) y 3' (SEQ ID NO: 51) ilustrativos:

5'-CCGCCGCTCGAGGGGTGTGTTTCGTCGA(N)₁₈-3' (SEQ ID NO: 50)

5'-AGTCCCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATC(N)₁₈-3' (SEQ ID NO: 51)

En el cebador 5' (SEQ ID NO: 50), la secuencia subrayada es un sitio *Xho* I; y el sitio *Xho* I y el DNA que sigue el sitio *Xho* I codifica los últimos siete aminoácidos de la secuencia líder de la albúmina de suero humana natural. En el SEQ

ID NO: 50, "(N)₁₈" es un ADN idéntico a los primeros 18 nucleótidos que codifican la proteína terapéutica de interés. En el cebador 3' (SEQ ID NO: 51), la secuencia subrayada es un sitio *Cla* I; y el sitio *Cla* I y el ADN que lo sigue son el complemento inverso del ADN que codifica los primeros 10 aminoácidos de la proteína HSA madura (SEQ ID NO: 1). En el SEQ ID NO: 51 "(N)₁₈" es el complemento inverso del ADN que codifica los últimos 18 nucleótidos que codifican la proteína terapéutica de interés. Utilizando estos dos cebadores, se puede amplificar mediante PCR la proteína terapéutica de interés, purificar el producto de PCR, digerirlo con enzimas de restricción *Xho* I y *Cla* I y clonarlo en los sitios *Xho* I y *Cla* I en el vector pC4:HSA.

Si se desea una secuencia líder alternativa, la secuencia líder de la albúmina nativa se puede reemplazar por el líder de albúmina quimérico, es decir, el péptido señal HSA-kex2, o un líder alternativo por medio de métodos convencionales conocidos en la técnica. (Por ejemplo, un experto en la técnica podría rutinariamente amplificar mediante PCR un líder alternativo y subclonar el producto de PCR en un constructo de fusión de albúmina en lugar del líder de albúmina mientras se mantiene el marco de lectura).

Ejemplo 6: Expresión general en líneas celulares de mamíferos.

Un constructo de fusión de albúmina generado en un vector de expresión compatible con la expresión en líneas celulares de mamífero se pueden transfectar a líneas celulares apropiadas mediante precipitación con fosfato de calcio, lipofectamina, electroporación, u otros métodos de transfección conocidos en la técnica y/o como describen Sambrook, Fritsch, y Maniatis. 1989. en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición" y en Ausubel et al. 2000. Hospital General de Massachusetts y Escuela Médica de Harvard "Current Protocols in Molecular Biology", volúmenes 1-4. Las células transfectadas se seleccionan a continuación por la presencia de un agente de selección determinado mediante el marcador seleccionable en el vector de expresión.

El vector de expresión pC4 (Núm. de Acceso de la ATCC 209646) es un derivado del plásmido pSV2-DHFR (Núm. de Acceso de la ATCC 37146). El pC4 contiene el promotor fuerte de Repeticiones Terminales Largas "LTR" del Virus del Sarcoma de Rous (Cullen et al., Marzo de 1985, Molecular and Cellular Biology, 438-447) y un fragmento del potenciador de citomegalovirus "CMV" (Boshart et al., 1985, Cell 41: 521-530). El vector también contiene el intrón 3', la señal de poliadenilación y terminación del gen de la preproinsulina de rata y el gen DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano de SV40. Para la transfección se utilizan células de ovario de hámster chino "CHO" u otras líneas celulares que carecen de un gen de DHFR activo. La transfección de un constructo de fusión de albúmina en pC4 a células CHO por medio de métodos conocidos en la técnica permitirá la expresión de la proteína de fusión de albúmina en células CHO, seguida de la secuencia líder de escisión, y la secreción al sobrenadante. La proteína de fusión de albúmina se purificado adicionalmente a continuación a partir del sobrenadante.

El vector de expresión pEE12.1 es suministrado por Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH) y es un derivado de pEE6 (Stephens y Cockett, 1989, Nucl. Acids Res. 17:7110). Este vector comprende un promotor, potenciador y región no traducida 5' completa del gen Temprano Inmediato Principal del citomegalovirus humano, "hCMV-MIE" (Publicación Internacional Núm. WO89/01036), aguas arriba de una secuencia de interés, y una gen de la glutamina sintetasa (Murphy et al., 1991, Biochem J. 227:277-279; Bebbington et al., 1992, Bio/Technology 10:169-175; Patente de Estados Unidos 5.122.464) para los propósitos de selección de células transfectadas en medio selectivo que contiene metionina sulfoximina. La transfección de constructos de fusión de albúmina preparados en pEE12.1 a células NS0 (Publicación Internacional Núm. WO86/05807) por medio de métodos conocidos en la técnica permitirá la expresión de la proteína de fusión de albúmina en células NS0, seguido de escisión de la secuencia líder, y la secreción en el sobrenadante. La proteína de fusión de albúmina se purifica adicionalmente a continuación a partir del sobrenadante utilizando mecanismos descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica.

La expresión de una proteína de fusión de albúmina puede ser analizada, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y transferencia Western, análisis mediante HPLC de fase inversa, u otros métodos conocidos en la técnica.

Se generan líneas celulares CHO y NS0 estables transfectadas con constructos de fusión de albúmina por medio de métodos conocidos en la técnica (p. ej., transfección con lipofectamina) y se seleccionan, por ejemplo, con metotrexato 100 nM para vectores que tienen el gen de la DiHidrofolato Reductasa 'DHFR' como marcador seleccionable o mediante cultivo en ausencia de glutamina. Los niveles de expresión pueden ser examinadas por ejemplo, mediante inmunotransferencia, principalmente, con un suero anti-HSA como anticuerpo primario, o, secundariamente, con suero que contiene anticuerpos dirigidos a la porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina dada como anticuerpo primario.

Los niveles de expresión se examinan mediante detección por inmunotransferencia con suero anti-HSA como anticuerpo primario. Las tasas de productividad específicas se determinan por medio de ELISA en el que el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo monoclonal contra la porción de proteína terapéutica de la fusión de albúmina y el anticuerpo de detección puede ser el anticuerpo monoclonal anti-HSA-biotinilado (o viceversa), seguido de unión de peroxidasa de rábano picante/estreptavidina y análisis de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ejemplo 7: Expresión de una proteína de fusión de albúmina en células de mamífero.

Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden expresar en una célula de mamífero. Un

vector de expresión de mamífero típico contiene un elemento promotor, que media el inicio de la transcripción del ARNm, una secuencia codificante de proteína, y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Los elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donadores y aceptores de corte y empalme de ARN. Se logra una transcripción altamente eficiente con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de Retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLV, HIV y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también se pueden utilizar elementos celulares (p. ej., el promotor de la actina humana).

Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como, pSVL y pMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146), pBC12MI (ATCC 67109), pCMVSPORT 2.0 y pCMVSPORT 3.0. Las células anfitrionas de mamífero que podrían usarse incluyen, pero no se limitan a, células Hela, 293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C 127 de ratón, Cos 1, Cos 7 y CV1, células QCI-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO).

Alternativamente, la proteína de fusión de albúmina puede ser expresada en líneas celulares estables que contienen el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de albúmina integrado en un cromosoma. La co-transfección con un marcador seleccionable tal como DHFR, gpt, neomicina, o higromicina permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas.

El polinucleótido transfectado que codifica la proteína de fusión también puede amplificarse para expresar grandes cantidades de la proteína de fusión codificada. El marcador de DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil en el desarrollo de líneas celulares que portan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. (Véase, p. ej., Alt et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); Hamlin et al., Biochem et Biophys Acta, 1097:107-143 (1990); Page et al., Biotechnology 9:64-68 (1991)). Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy et al., Biochem J. 227:277-279 (1991); Bebbington et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992)). Utilizando estos marcadores, las células de mamífero se cultivan en medio selectivo y se seleccionan las células con la resistencia más alta. Estas líneas celulares contienen el gen o los genes amplificados integrados en un cromosoma. Con frecuencia se utilizan células de ovario de hámster chino (CHO) y NS0 para la producción de proteínas.

Los derivados del plásmido pSV2-dhfr (Núm. de Acceso de la ATCC 37146), los vectores de expresión de pC4 (Núm. de Acceso ATCC 209646) y pC6 (Núm. de Acceso de la ATCC 209647) contienen el promotor fuerte (LTR) del Virus del Sarcoma de Rous (Cullen et al., Molecular and Cellular Biology, 438-447 (Marzo, 1985)) más un fragmento del potenciador de CMV (Boshart et al., Cell 41: 521-530 (1985)). Los múltiples sitios de clonación, p. ej., con los sitios de escisión de enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores también contienen el intrón 3', la señal de poliadenilación y terminación del gen de preproinsulina de rata y el gen DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano de SV40.

Específicamente, el plásmido pC6, por ejemplo, se digiere con enzimas de restricción apropiadas y después se desfosforila utilizando fosfatos de intestino de ternera mediante procedimientos conocidos en la técnica. El vector se aísla a continuación a partir de un gel de agarosa al 1%.

Se genera un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención utilizando técnicas conocidas en la técnica y este polinucleótido se amplifica utilizando la tecnología de PCR conocida en la técnica. Si se utiliza una secuencia de señal natural para producir la proteína de fusión de la presente invención, el vector no necesita un segundo péptido señal. Alternativamente, si no se utiliza una secuencia de señal natural, el vector puede modificarse para incluir una secuencia señal heteróloga. (Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Núm. WO 96/34891).

El fragmento amplificado que codifica la proteína de fusión de la invención se aísla de un gel de agarosa al 1% utilizando un kit disponible comercialmente ("GeneClean", BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). El fragmento se digiere a continuación con enzimas de restricción apropiadas y se purifica de nuevo en un gel de agarosa al 1%.

El fragmento amplificado que codifica la proteína de fusión de albúmina de la invención se digiere a continuación con la misma enzima de restricción y se purifica en un gel de agarosa al 1%. El fragmento aislado y el vector desfosforilado se ligan después con DNA ligasa T4. Las células de E. coli HB101 o XL-1 Blue se transforman a continuación y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido pC6 utilizando, por ejemplo, análisis de enzimas de restricción.

Las células de ovario de hámster chino que carecen de un gen DHFR activo se utilizan para la transfección. Cinco µg del plásmido de expresión de pC6 o pC4 se co-transfectan con 0,5 µg del plásmido pSVneo utilizando lipofectina (Felgner et al., más arriba). El plásmido pSV2-neo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen neo de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos incluyendo G418. Las células se siembran en MEM alfa menos con un suplemento de 1 mg/mL de G418. Después de 2 días, las células se tratan con tripsina y se siembran en placas de clonación de hibridoma (Greiner, Alemania) en MEM alfa menos con un suplemento de 10, 25, o 50 ng/mL de metotrexato más 1 mg/mL de G418. Después de aproximadamente 10-14 días los clones individuales se tratan con tripsina y a continuación se siembran en placas Petri de 6 pocillos o matraces de 10 mL utilizando diferentes concentraciones de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los

clones que crecen a las mayores concentraciones de metotrexato se transfieren después a nuevas placas de 6 pocillos que contienen concentraciones incluso mayores de metotrexato (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 mM, 20 mM). Se repite el mismo procedimiento hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración de 100 a 200 μ M. La expresión de la proteína de fusión deseada se analiza, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y transferencia Western o mediante análisis HPLC de fase inversa.

Ejemplo 8: Purificación general de una proteína de fusión de albúmina expresada a partir de un constructo de fusión de albúmina en líneas celulares de mamífero

En realizaciones preferidas, proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden la forma madura de HSA fusionada a cualquiera de los extremos N o C de la forma madura de una proteína terapéutica o porciones de la misma (p. ej., la forma madura de una proteína terapéutica enumerada en la Tabla 1, o la forma madura de una proteína terapéutica mostrada en la Tabla 2 como SEQ ID NO: Z). En una realización de la invención, las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden adicionalmente una secuencia señal que dirige el polipéptido de fusión naciente en las rutas de secreción del anfitrión utilizado para la expresión. En una realización preferida, el péptido señal codificado por la secuencia de señal se retira, y la proteína de fusión de albúmina madura se secreta directamente al medio de cultivo. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden preferiblemente secuencias señal heterólogas (p. ej., la secuencia señal no nativa de una proteína terapéutica concreta), incluyendo, pero no limitada a, MAF, INV, Ig, Fibulina B, Clusterina, Proteína 4 de Unión al Factor de Crecimiento Similar a la Insulina, secuencias de líder de HSA variantes, incluyendo, pero no limitadas a, una secuencia líder de HSA/MAF quimérica, u otras secuencias señal heterólogas conocidas en la técnica. Se prefiere especialmente que las secuencias señal enumeradas en la Tabla 2 y/o la secuencia señal enumerada en la sección "Expresión de Proteínas de Fusión" y/o "Métodos Adicionales de Producción Sintética y Recombinante de Proteínas de Fusión de Albúmina" de la memoria descriptiva, anteriormente. En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de la invención comprenden adicionalmente un residuo de metionina N-terminal. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, incluyendo fragmentos y/o variantes, también están incluidos en la invención.

Las proteínas de fusión de albúmina de sobrenadantes de la línea de células de mamíferos se purifican de acuerdo con diferentes protocolos, dependiendo del sistema de expresión utilizado.

Purificación de líneas de células CHO y 293T

La purificación de una proteína de fusión de albúmina a partir del sobrenadante de células CHO o de sobrenadante de células 293T transfectadas transitoriamente puede implicar la captura inicial con una resina HQ aniónica utilizando un tampón de fosfato de sodio y una elución en gradiente de fosfato, seguido por cromatografía de afinidad en una columna Blue Sefarosa FF utilizando una elución en gradiente de sal. Blue Sefarosa FF elimina los principales contaminantes de BSA/fetuina. La purificación adicional sobre la resina Poros PI 50 con un gradiente de fosfato puede eliminar y reducir la contaminación de endotoxina así como concentrar la proteína de fusión de albúmina.

Purificación de la línea celular NS0

La purificación de una proteína de fusión de albúmina a partir de sobrenadante de células NS0 puede implicar cromatografía de intercambio aniónico con Q-Sefarosa, seguido de purificación con SP-Sefarosa con una etapa de elución, seguido de purificación con Phenil-650M con una etapa de elución, y, en última instancia, diafiltración.

La proteína purificada puede ser formulada a continuación mediante intercambio de tampón.

Ejemplo 9: Expresión bacteriana de una proteína de fusión de albúmina

Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención que comprende una secuencia señal bacteriana se amplifica utilizando cebadores oligonucleótidos de PCR correspondientes a los extremos 5' y 3' de la secuencia de ADN, para sintetizar fragmentos de inserción. Los cebadores utilizados para amplificar el polinucleótido que codifica el inserto deben contener preferiblemente sitios de restricción, tales como BamHI y XbaI, en el extremo 5' de los cebadores con el fin de clonar el producto amplificado en el vector de expresión. Por ejemplo, BamHI y XbaI corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión bacteriano pQE-9. (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). Este vector plasmídico codifica la resistencia a antibióticos (Amp^r), un origen bacteriano de replicación (ori), un promotor/operador regulable por IPTG (P/O), un sitio de unión al ribosoma (RBS), una etiqueta de 6-histidina (6-His), y sitios de clonación de enzimas de restricción.

El vector pQE-9 se digiere con BamHI y XbaI y el fragmento amplificado se liga al vector pQE-9 manteniendo el marco de lectura iniciada en el RBS bacteriano. La mezcla de ligación se utiliza a continuación para transformar la cepa de E. coli M15/rep4 (Qiagen, Inc.) que contiene múltiples copias del plásmido pREP4, que expresa el represor lacI y también confiere resistencia a kanamicina (Kan^r). Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y se seleccionan las colonias resistentes a ampicilina/kanamicina. El ADN del plásmido se aísla y se confirma mediante análisis de restricción.

Los clones que contienen los constructos deseados se cultivan durante la noche (O/N) en cultivo líquido en medio LB

con un suplemento tanto de Amp (100 µg/ml) como de Kan (25 µg/ml). El cultivo O/N se usa para inocular un cultivo grande en una proporción de 1:100 a 1:250. Las células se cultivan hasta una densidad óptica 600 (D.O.⁶⁰⁰) de entre 0,4 y 0,6. Se añade IPTG (isopropil-BD-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM. El IPTG induce mediante inactivación el represor lacI, aclarando el P/O lo que conduce a un aumento de la expresión génica.

Las células se cultivan durante un 3 a 4 horas adicionales. Después las células se recogen mediante centrifugación (20 minutos a 6000Xg). El sedimento celular se solubiliza en el agente caotrópico de Guanidina HCl 6 Molar o preferiblemente en urea 8 M y concentraciones superiores a 2-mercaptoetanol 0,14 M mediante agitación durante 3-4 horas a 4°C (véase, p. ej., Burton et al., Eur. J. Biochem. 179:379-387 (1989)). Los restos celulares se eliminan mediante centrifugación, y el sobrenadante que contiene el polipéptido se carga en una columna de resina de afinidad de níquel-ácido nitrilo-tri-acético ("Ni-NTA") (disponible de QIAGEN, Inc., *más arriba*). Las proteínas con una etiqueta 6 x His se unen a la resina de Ni-NTA con alta afinidad y pueden purificarse en un procedimiento sencillo de una sola etapa (para más detalles véase: The QIAexpressionist (1995) QIAGEN, Inc., *más arriba*).

En resumen, el sobrenadante se carga en la columna en guanidina-HCl 6 M, pH 8. La columna se lava primero con 10 volúmenes de guanidina 6 M-HCl, pH 8, después se lava con 10 volúmenes de guanidina-HCl 6 M de pH 6, y, finalmente, el polipéptido se eluye con guanidina-HCl 6 M, pH 5.

La proteína purificada se renaturaliza continuación dializándola frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón de Na-acetato 50 mM, de pH 6 más NaCl 200 mM. Alternativamente, la proteína puede replegarse con éxito mientras está inmovilizada en la columna de Ni-NTA. Las condiciones ilustrativas son las siguientes: renaturalizar utilizando un gradiente lineal de urea 6M-1M en NaCl 500 mM, glicerol al 20%, Tris/HCl 20 mM de pH 7,4, que contiene inhibidores de proteasa. La renaturalización debe realizarse durante un período de 1,5 horas o más. Después de la renaturalización las proteínas se eluyen mediante la adición de imidazol 250 mM. El imidazol se elimina mediante una etapa final de diálisis frente a PBS o tampón de acetato de sodio 50 mM de pH 6 más NaCl 200 mM. La proteína purificada se almacena a 4°C o se congela a -80°C.

Además del vector de expresión anterior, la presente invención incluye adicionalmente un vector de expresión, denominado pHE4a (Número de Acceso de la ATCC 209645, depositado el 25 de Febrero, 1998) que contiene elementos operadores y promotores del fago conectados operativamente a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, denominado pHE4a. (Número de Acceso de la ATCC 209645, depositado el 25 de febrero, 1998.) Este vector contiene: 1) un gen de neomicinofototransferasa como marcador de selección, 2) un origen de replicación de E. coli, 3) una secuencia del promotor del fago T5, 4) dos secuencias del operador lac, 5) una secuencia de Shine-Delgarno, y 6) el gen represor del operón lactosa (lacIq). El origen de replicación (oriC) deriva de pUC19 (LTI, Gaithersburg, MD). Las secuencias del promotor y del operador se preparan sintéticamente.

El ADN se puede insertar en pHE4a mediante la restricción del vector con NdeI y XbaI, BamHI, XhoI o Asp718, ejecutando el producto restringido en un gel, y aislando el fragmento mayor (el fragmento de relleno debe tener aproximadamente 310 pares de bases). El inserto de ADN se genera de acuerdo a los protocolos de PCR descritos en la presente memoria o de otra manera conocida en la técnica, utilizando cebadores de PCR que tienen sitios de restricción para NdeI (cebador 5') y XbaI, BamHI, XhoI o Asp718 (cebador 3'). El inserto de PCR es purificado en gel y restringido con enzimas compatibles. El inserto y el vector se ligan de acuerdo con protocolos convencionales.

El vector de modificado genéticamente puede ser sustituido en el protocolo anterior para expresar proteína en un sistema bacteriano.

Ejemplo 10: Aislamiento de un clon de ADNc seleccionado de la muestra depositada.

Muchas de los constructos de fusión de la albúmina de la invención se han depositado en la ATCC como se muestra en la Tabla 3. Los constructos de fusión de albúmina pueden comprender uno cualquiera de los siguientes vectores de expresión: el vector de expresión de levadura S. cerevisiae pSAC35, el vector de expresión de mamífero pC4, o el vector de expresión de mamífero pEE12.1.

Los vectores pSAC35 (Sleep et al., 1990, Biotechnology 8:42), pC4 (Núm. de Acceso de la ATCC 209646; Cullen et al., Molecular and Cellular Biology, 438-447 (1985); Boshart et al., Cell 41: 521- 530 (1985)), y pEE12.1 (Lonza Biologics, Inc.; Stephens y Cockett, Nucl Acids Res 17:7110 (1989); Publicación Internacional Núm. WO89/01036; Murphy et al., Biochem J. 227:277-279 (1991); Bebbington et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992); Patente de Estados Unidos 5.122.464; Publicación internacional Núm. WO86/05807) comprenden un gen de resistencia a la ampicilina para el crecimiento en células bacterianas. Estos vectores y/o un constructo de fusión de albúmina que los comprende pueden ser transformados en una cepa de E. coli tal como Stratagene XL-I Blue (Stratagene Cloning Systems, Inc., 11011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037) utilizando mecanismos descritos en la técnica tales como Hanahan, se extendieron en placas de agar Caldo Luria que contienen 100 µg/mL de ampicilina, y se cultivan durante la noche a 37°C.

El material depositado en la muestra asignada al número de depósito de la ATCC citado en la Tabla 3 para cualquier constructo de fusión de albúmina dado también puede contener uno o más constructos de fusión de albúmina, codificando cada uno diferentes proteínas de fusión de la albúmina. Por lo tanto, los depósitos que comparten el

mismo número de depósito de la ATCC contienen al menos un constructo de fusión de albúmina identificado en la fila correspondiente de la Tabla 3.

Se pueden utilizar dos enfoques para aislar un constructo de fusión de albúmina concreto, a partir de la muestra depositada de los ADN plasmídicos citados para ese constructo de fusión de albúmina en la Tabla 3.

5 **Método 1: Escrutinio**

En primer lugar, se puede aislar directamente un constructo de fusión de albúmina escrutando la muestra de ADN plasmídicos depositados utilizando una sonda polinucleotídica correspondiente al SEQ ID NO: X para un número de ID de constructo individuo en la Tabla 1, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede sintetizar un polinucleótido específico con 30-40 nucleótidos utilizando un sintetizador de ADN de Applied Biosystems de acuerdo con la secuencia referida. El oligonucleótido se puede marcar, por ejemplo, con ³²P-γ-ATP utilizando polinucleótido quinasa de T4 y purificar de acuerdo con métodos rutinarios (p. ej., Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)). El constructo de fusión de albúmina de un depósito ATCC dado se transforma en un anfitrión adecuado, como se indica anteriormente (tal como XL-1 Blue (Stratagene)) utilizando mecanismos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los proporcionados por el proveedor del vector o en publicaciones o patentes relacionadas citadas anteriormente. Los transformantes se siembran en placas de agar al 1,5% (que contiene el agente de selección apropiado, p. ej., ampicilina) a una densidad de aproximadamente 150 transformantes (colonias) por placa. Estas placas son seleccionadas utilizando membranas de nailon de acuerdo con métodos rutinarios para la detección de colonias bacterianas (p. ej., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, páginas 1.93 a 1.104), u otros mecanismos conocidos por los expertos en la técnica.

Método 2: PCR

Alternativamente, el ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina dada puede amplificarse a partir de una muestra de un constructo de fusión de albúmina depositado con el SEQ ID NO: X, por ejemplo, utilizando dos cebadores de 17-20 nucleótidos que se hibridan al constructo de fusión de albúmina depositado 5' y 3' con respecto al ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina dada. La reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo en condiciones rutinarias, por ejemplo, en 25 µl de mezcla de reacción con 0,5 µg del molde de ADNc anterior. Una mezcla de reacción conveniente es MgCl₂ de 1,5 a 5 mM, gelatina al 0,01% (p/v), 20 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 25 pmoles de cada cebador y 0,25 Unidades de polimerasa Taq. Se realizan treinta y cinco ciclos de PCR (desnaturalización a 94°C durante 1 min; hibridación a 55°C durante 1 min; elongación a 72°C durante 1 min) con un ciclador térmico automatizado Perkin-Elmer Cetus. El producto amplificado se analiza por electroforesis en gel de agarosa y la banda de ADN con el peso molecular esperado se escinde y se purifica. Se verifica que el producto de PCR es la secuencia seleccionada subclonando y secuenciando el producto de ADN.

Hay varios métodos disponibles para la identificación de las porciones no codificante 5' o 3' de un gen que puede no estar presente en el clon depositado. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, sondeo del filtro, enriquecimiento del clon utilizando sondas específicas y protocolos similares o idénticos a protocolos "RACE" 5' y 3' que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, está disponible un método similar a RACE 5' para generar el extremo 5' perdido de un transcrito completo deseado. (Fromont-Racine et al., Nucleic Acids Res, 21 (7):1683-1684 (1993)).

En resumen, un oligonucleótido de ARN específico se liga a los extremos 5' de una población de ARN que contiene presumiblemente transcritos de ARN del gen completo. Se utilizan un conjunto de cebadores que contiene un cebador específico para el oligonucleótido de ARN ligado y un cebador específico para una secuencia conocida del gen de interés se utiliza para amplificar mediante PCR la porción 5' del gen completo deseado. Este producto amplificado puede ser a continuación secuenciado y utilizado para generar el gen completo.

Este método anterior empieza con el ARN total aislado de la fuente deseada, aunque se puede utilizar poli A + ARN. La preparación de ARN puede tratarse a continuación con fosfatasa si fuera necesario para eliminar grupos fosfato 5' en ARN degradado o dañado que puede interferir con la posterior etapa de ARN ligasa. La fosfatasa debe ser inactivada a continuación y el ARN se trata con pirofosfatasa ácida de tabaco con el fin de quitar la estructura de protección terminal presente en los extremos 5' de los ARN mensajeros. Esta reacción deja un grupo fosfato 5' en el extremo 5' del ARN con la protección terminal escindida que puede ser ligado a continuación a un oligonucleótido de ARN utilizando ARN ligasa de T4.

Esta preparación de ARN modificado se usa como molde para la síntesis de la primera cadena de ADNc utilizando un oligonucleótido específico del gen. La primera reacción de síntesis de la cadena se usa como molde para la amplificación mediante PCR del extremo 5' deseado, utilizando un cebador específico para el oligonucleótido de ARN ligado y un cebador específico para la secuencia conocida del gen de interés. El producto resultante se secuenciará y se analiza después para confirmar que la secuencia del extremo 5' pertenece al gen deseado.

55 **Ejemplo 11: Fusiones multifusión**

Las proteínas de fusión de albúmina (p. ej., que contienen una proteína terapéutica (o un fragmento o variante de la misma) fusionada a albúmina (o un fragmento o variante de la misma)), se puede fusionar además a otras proteínas

para generar "proteínas multifusión". Estas proteínas multifusión se pueden utilizar para diversas aplicaciones. Por ejemplo, la fusión de las proteínas de fusión de albúmina de la invención a etiqueta His, etiqueta HA, proteína A, dominios de IgG, y proteína de unión a maltosa facilita la purificación. (Véase, p. ej., EP A 394.827; Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988)). Las señales de localización nuclear fusionadas con los polipéptidos de la presente invención pueden dirigir la proteína a una localización subcelular específica, mientras que el heterodímero covalente u homodímeros pueden aumentar o disminuir la actividad de una proteína de fusión de albúmina. Además, la fusión de secuencias de proteínas adicionales a las proteínas de fusión de albúmina de la invención puede aumentar adicionalmente la solubilidad y/o estabilidad de la proteína de fusión. Las proteínas de fusión descritas anteriormente pueden prepararse utilizando o modificando rutinariamente mecanismos conocidos en la técnica y/o modificando el siguiente protocolo, que esboza la fusión de un polipéptido a una molécula de IgG.

En resumen, la porción Fc humana de la molécula de IgG se puede amplificar mediante PCR, utilizando cebadores que abarcan los extremos 5' y 3' de la secuencia descrita a continuación. Estos cebadores también deberían tener sitios de enzimas de restricción convenientes que facilitarán la clonación en un vector de expresión, preferiblemente un vector de expresión de mamífero o de levadura.

Por ejemplo, si se usa pC4 (Núm. de Acceso de la ATCC 209646), la porción Fc humana puede ligarse al sitio de clonación BamHI. Obsérvese que el sitio BamHI 3' debe ser destruido. A continuación, el vector que contiene la porción Fc humana se vuelve a someter a restricción con BamHI, linealizando el vector, y un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención (generado y aislado utilizando mecanismos conocidos en la técnica), se liga a este sitio BamHI. Obsérvese que el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención se clona sin un codón de parada, de lo contrario no se producirá una proteína de fusión que contiene Fc.

Si se utiliza la secuencia señal de origen natural para producir la proteína de fusión de albúmina de la presente invención, pC4 no necesita un segundo péptido señal. Alternativamente, si no se utiliza la secuencia señal natural, el vector puede modificarse para incluir una secuencia señal heteróloga. (Véase, p. ej., la Publicación Internacional Núm. WO 96/34891.)

Región Fc de IgG humana:

```
GGGATCCGGAGCCAAATCTTCTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACTGAATTCGAGGGTGCACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACTCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTAAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTICAACCTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCG
TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAACCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGA
GCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCGCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAATGAGTCCGACGGCCGCGACTCTAGAGGAT (SEQ ID NO:52)
```

Ejemplo 12: Producción de un anticuerpo a partir de una proteína de fusión de albúmina

Tecnología de hibridoma

Los anticuerpos que se unen las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención y porciones de las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención (p. ej., la porción de proteína terapéutica o una porción de la proteína de fusión de albúmina) se pueden preparar por medio de una variedad de métodos. (Véase, Current Protocols, Capítulo 2). Como ejemplo de tales métodos, se prepara una preparación de una proteína de fusión de albúmina de la invención o una porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención y se purifica para dejarla sustancialmente libre de contaminantes naturales. Tal preparación se introduce después en un animal para producir antisueros policlonales de mayor actividad específica.

Los anticuerpos monoclonales específicos para una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención, se preparan utilizando tecnología de hibridoma (Kohler et al., Nature 256:495 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, NY., págs. 563-681 (1981)). En general, un animal (preferiblemente un ratón) se inmuniza con una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Los esplenocitos de tales ratones se extraen y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada. Se puede emplear cualquier línea celular de mieloma adecuada de acuerdo con la presente invención; sin embargo, es preferible emplear la línea celular de mieloma parental (SP2O), disponible de la ATCC. Después de la fusión, las células de hibridoma resultantes se mantienen selectivamente en medio HAT, y a continuación se clonan mediante dilución limitante como describen Wands et al. (Gastroenterology 80:225-232 (1981)). Las células de hibridoma obtenidas a través de tal selección se analizan a continuación para identificar clones que secretan anticuerpos capaces de unirse a una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención.

Alternativamente, se pueden producir anticuerpos adicionales capaces de unirse a una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención en un procedimiento de dos etapas utilizando anticuerpos anti-idiotípicos. Tal método hace uso del hecho de que los propios anticuerpos son antígenos, y por lo tanto, es posible obtener un anticuerpo que se une a un segundo anticuerpo. De acuerdo con este método, se utilizan anticuerpos específicos de la proteína para inmunizar a un animal, preferiblemente un ratón. Los esplenocitos de tal animal se utilizan después para producir células de hibridoma, y se escrutan las células de hibridoma para identificar clones que producen un anticuerpo cuya capacidad para unirse al anticuerpo específico de la proteína de fusión de albúmina de la invención (o porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención) puede ser bloqueada por la proteína de fusión de la invención, o una porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Tales anticuerpos comprenden anticuerpos anti-idiotípicos contra el anticuerpo específico de la proteína de fusión de la invención (o porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención) y se utilizan para inmunizar un animal para inducir la formación de más anticuerpos específicos de la proteína de fusión de la invención (o porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención).

Para el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos, el anticuerpo es "humanizado". Tales anticuerpos pueden producirse utilizando constructos genéticos derivados de células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos y humanizados son conocidos en la técnica y se comentan en la presente memoria. (Véanse, para su revisión, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Cabilly et al., Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567; Taniguchi et al., documento EP 171.496; Morrison et al., documento EP 173.494.; Neuberger et al., documento WO 8601533; Robinson et al., publicación internacional Núm. WO 8702671; Boulianne et al., Nature 312: 643 (1984); Neuberger et al., Nature 314:268 (1985)).

Aislamiento de Fragmentos de Anticuerpos Dirigidos contra una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención de una Biblioteca de scFv. Se construyen genes V de origen natural aislados de PBL humanos en una biblioteca de fragmentos de anticuerpo que contienen reactividades contra una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención, a la que el donante puede haber sido o puede no haber sido expuesto (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos 5.885.793 incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad).

Rescate de la Biblioteca. Se construye una biblioteca de scFv a partir del ARN de PBL humanos como se describe en la Publicación Internacional Núm. WO 92/01047. Para rescatar los fragmentos de anticuerpos de presentación en fagos, se utilizan aproximadamente 10^9 E. coli que albergaban el fagémido para inocular 50 mL de 2xTY que contiene glucosa al 1% y 100 µg/mL de ampicilina (2xTY-AMP-GLU) y se cultivan hasta una D.O. de 0,8 con sacudimiento. Cinco mililitros de este cultivo se utilizan para inocular 50 mL de 2xTY-AMP-GLU, se añaden 2×10^8 UT de coadyuvante de gen 3 delta (gen III delta de M13, véase la Publicación Internacional Núm. WO 92/01047) y el cultivo se incuba a 37°C durante 45 minutos sin sacudimiento y a continuación a 37°C durante 45 minutos con sacudimiento. El cultivo se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min. y el sedimento se resuspende en 2 litros de 2xTY que contienen 100 mg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de kanamicina y se cultivan durante la noche. El fago se prepara como se describe en la Publicación Internacional Núm. WO 92/01047.

El gen III delta de M13 se prepara como sigue: el fago auxiliar del gen III delta M13 no codifica la proteína del gen III, por lo tanto, el fago o fagémido que presenta fragmentos de anticuerpo tiene una mayor avidez de unión a antígeno. Se preparan partículas infecciosas del gen III delta de M13 cultivando el fago auxiliar en células que albergan un derivado de pUC19 que suministra la proteína del gen III de tipo salvaje durante la morfogénesis del fago. El cultivo se incuba durante 1 hora a 37°C sin sacudimiento y después durante una hora más a 37°C con sacudimiento. Las células se centrifugan (IEC-Centra 8.400 rpm durante 10 min), se resuspenden en 300 mL de caldo 2xTY que contiene 100 µg de ampicilina/mL y 25 µg de kanamicina/mL (2xTY-AMP-KAN) y se cultivan durante la noche, con sacudimiento a 37°C. Las partículas de fago se purifican y se concentran a partir del medio de cultivo mediante dos precipitaciones con PEG (Sambrook et al., 1990), se resuspenden en 2 mL de PBS y se hacen pasar a través de un filtro de 0,45 µm (Minisart NML; Sartorius) para proporcionar una concentración final de aproximadamente 10^{10} de unidades de transducción/mL (clones resistentes a ampicilina).

Inmunoabsorción de la Biblioteca. Se recubren durante la noche inmunotubos (Nunc) en PBS con 4 mL o de 100 µg/mL o de 10 µg/mL de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Los tubos se bloquean con Marvel-PBS al 2% durante 2 horas a 37°C y después se lavan 3 veces en PBS. Se aplican al tubo aproximadamente 10^{13} UT de fagos y se incuba durante 30 minutos mediante volteo a temperatura ambiente encima y debajo de una plataforma giratoria y a continuación se deja reposar durante otras 1,5 horas. Los tubos se lavan 10 veces con PBS, Tween-20 al 0,1% y 10 veces con PBS. Los fagos se eluyen mediante la adición de 1 mL de trietilamina 100 mM y haciendo girar durante 15 minutos debajo y encima de una plataforma giratoria después de lo cual la solución se neutraliza inmediatamente con 0,5 mL de Tris-HCl 1,0 M, pH 7,4. Los fagos se utilizan después para infectar 10 mL de TGI de E. coli semilogarítmica mediante la incubación del fago eluido con las bacterias durante 30 minutos a 37°C. Las E. coli se siembran en placas de TYE que contienen glucosa al 1% y 100 µg/mL de ampicilina. La biblioteca bacteriana resultante se rescató entonces con el fago auxiliar del gen 3 delta como se ha descrito anteriormente para preparar el fago para una posterior ronda de selección. Este procedimiento se repite a continuación durante un total de 4 rondas de purificación por afinidad aumentando el lavado de los tubos a 20 veces con PBS, Tween-20 al 0,1% y 20 veces con PBS para las rondas 3 y

4.

Caracterización de aglutinantes. Los fagos eluidos de la 3ª y 4ª rondas de selección se utilizan para infectar *E. coli* HB 2151 y se produce scFv soluble (Marks, et al., 1991) a partir de colonias individuales para el ensayo. Los ELISA se realizan con placas de microtitulación recubiertas con 10 pg/mL de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una porción de una proteína de fusión de albúmina de la invención, en bicarbonato 50 mM de pH 9,6. Los clones positivos en ELISA se caracterizan adicionalmente por la huella dactilar de PCR (véase, por ejemplo, la publicación internacional Núm. WO 92/01047) y a continuación mediante secuenciación. Estos clones positivos de ELISA también pueden caracterizarse adicionalmente mediante mecanismos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mapeo de epítomos, afinidad de unión, transducción de señales del receptor, capacidad para bloquear o inhibir competitivamente la unión anticuerpo/antígeno y actividad agonística o antagonista competitiva.

Ejemplo 13: Análisis de absorción de [³H]-2-desoxiglucosa.

El tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado son los tejidos sensibles a la insulina. La insulina puede estimular la captación/transporte de glucosa en estos tejidos. En el caso del tejido adiposo y el músculo esquelético, la insulina inicia la transducción de señales que finalmente conduce a la translocación de la molécula de transportador de glucosa 4, GLUT4, desde un compartimento intracelular especializado a la superficie celular. Una vez en la superficie celular, GLUT4 permite la captación/transporte de glucosa.

Captación de [³H]-2-desoxiglucosa

Se pueden utilizar varias líneas celulares relacionada con tejido adiposo y músculo para someter a ensayo la actividad de captación/transporte de glucosa en la ausencia o presencia de una combinación de uno cualquiera o más de los fármacos terapéuticos enumerados para el tratamiento de la diabetes mellitus. En particular, los fibroblastos murinos 3T3-L1 y las células del músculo esquelético murino L6 pueden diferenciarse a adipocitos 3T3-L1 y a miotubos, respectivamente, para servir cuando sea apropiado en modelos in vitro para el análisis de captación de [³H]-2-desoxiglucosa (Urso et al., J Biol Chem, 274 (43):30864-73 (1999); Wang et al., J Mol Endocrinol, 19 (3):241-8 (1997); Haspel et al., J Membr Biol, 169 (1):45-53 (1999); Tsakiridis et al., Endocrinology, 136(10): 4315-22 (1995)). Brevemente, se transfieren 2 x 10⁵ células/100 µL de adipocitos o células L6 diferenciadas a placas de 96 pocillos de cultivo de tejidos, "TC", tratadas, es decir, recubiertas con 50 µg/mL de poli-L-lisina, en medio post-diferenciación y se incuban durante la noche a 37°C en CO₂ al 5%. Las células se lavan primero una vez con medio DMEM de bajo contenido de glucosa libre de suero y a continuación se hacen ayunar con 100 µL/pocillo del mismo medio y con 100 µL/pocillo de tampón o de una combinación de uno cualquiera o más de los fármacos terapéuticos enumerados para el tratamiento de la diabetes mellitus, por ejemplo, concentraciones crecientes de 1 nM, 10 nM, y 100 nM de los agentes terapéuticos de la presente invención (p. ej., fusiones específicas descritas como SEQ ID NO:Y y fragmentos y variantes de las mismas) durante 16 horas a 37°C en ausencia o presencia de insulina 1 nM. Las placas se lavan tres veces con 100 µL/pocillo de solución salina tamponada con HEPES. Se añade la insulina a 1 nM en solución salina tamponada con HEPES durante 30 minutos a 37°C en presencia de [³H]-2-desoxiglucosa marcada 10 mM (Amersham, Núm. TRK672) y 2-desoxiglucosa no marcada 10 M (SIGMA, D- 3179). Como control, se llevan a cabo las mismas condiciones, excepto por la ausencia de insulina. Se añade una concentración final de citocalasina B 10 mM (Sigma, C6762) a 100 µL/pocillo en un pocillo separado para medir la absorción no específica. Las células se lavan tres veces con solución salina tamponada con HEPES. Se añaden, [³H]-2-desoxiglucosa marcada, es decir, 10 µM, y no marcada, es decir, 2-desoxiglucosa 10 µM, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavan tres veces con solución salina tamponada con fosfato fría, "PBS". Las células se lisan con la adición de 150 µL/pocillo de NaOH 0,2 N y posterior incubación con sacudimiento durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se transfieren a continuación a un vial de centelleo al cual se añaden 5 mL de líquido de centelleo. Los viales se cuentan en un contador de Centelleo Beta. La captación en condiciones duplicadas, siendo la diferencia la ausencia o presencia de insulina, se determina con la siguiente ecuación: [(Recuento de insulina por minuto "cpm" - Cpm no específicas)/(Cpm no de insulina - Cpm no específicas)]. Las respuestas promedio caen dentro de los límites de aproximadamente 5 veces y 3 veces las de los controles para adipocitos y miotubos, respectivamente.

Diferenciación de células

Se permite que las células se conviertan en completamente confluentes en un matraz T-75 cm². El medio se retira y se reemplaza por 25 mL de medio de pre-diferenciación durante 48 horas. Las células se incuban a 37°C, en CO₂ al 5%, humedad de 85%. Después de 48 horas, el medio de pre-diferenciación se elimina y se reemplaza por 25 mL de medio de diferenciación durante 48 horas. Las células se incuban de nuevo a 37°C, en CO₂ al 5%, humedad de 85%. Después de 48 horas, el medio se elimina y se reemplaza por 30 mL de medio post-diferenciación. El medio post-diferenciación se mantiene durante 14-20 días o hasta que se consigue la diferenciación completa. El medio se cambia cada 2-3 días. Los adipocitos humanos se pueden adquirir de Zen-Bio, INC (Núm. SA-1096).

Ejemplo 14: Análisis in vitro de incorporación de [³H]-timidina a líneas celulares de páncreas.

Recientemente se ha demostrado que GLP-1 induce la diferenciación de la línea celular de epitelio ductal pancreático de rata ARIP de una manera dependiente del tiempo y de la dosis que se asocia con un aumento del

Homeobox-1 Duodenal de los islotes (IDX-I) (Hui et al., 2001, Diabetes, 50(4): 785-96) y los niveles de ARNm de insulina. El IDX-I a su vez aumenta los niveles de ARNm del receptor de GLP-1.

Tipos celulares sometidos a ensayo

- 5 Células RIN-M: Estas células están disponibles en la Colección de Cultivos Tipo Americana (Número de Línea Celular ATCC CRL-2057). La línea celular RIN-M se deriva de un tumor de células de los islotes de rata transplantable inducido por la radiación. La línea se estableció a partir de un xenoinjerto del tumor de ratón carente de sistema inmunitario. Las células producen y secretan hormonas polipeptídicas de los islotes, y producen L-dopa descarboxilasa (un marcador para células que tienen la actividad de captación y descarboxilación del precursor de amina, o APUD).
- 10 Células ARIP: Estas son células exocrinas pancreáticas de morfología epitelial disponibles de la Colección de Cultivos Tipo Americana (Número de Línea Celular ATCC CRL-1674). Véanse también, las referencias: Jessop, N.W. y Hay, R.J., "Characteristics of two rat pancreatic exocrine cell lines derived from transplantable tumors," In Vitro 16:212, (1980); Cockell, M. et al., "Identification of a cell-specific DNA-binding activity that interacts with a transcriptional activator of genes expressed in the acinar pancreas", Mol. Cell. Biol. 9:2464-2476, (1989); Roux, E., et al. "The cell-specific transcription factor PTF1 contains two different subunits that interact with the DNA" Genes Dev. 3:1613-1624, (1989); y, Hui, H., et al., "Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells," Diabetes 50:785-796 (2001).

Preparación de las células

- 20 La línea celular RIN-M se cultiva en medio RPMI 1640 (Hyclone, Núm. SH300027.01) con suero bovino fetal al 10% (Hyclone, Núm. SH30088.03) y se subcultivan cada 6 a 8 días a una razón de 1:3 a 1:6. El medio se cambia cada 3 a 4 días.

La línea celular ARIP (ATCC Núm. CRL-1674) se cultiva en un medio de Ham F12K (ATCC, Núm. 30- 2004) con L-glutamina 2 mM ajustada para contener 1,5 g/L de bicarbonato de sodio y suero bovino fetal al 10%. La línea celular ARIP se subcultiva a una razón de 1:3 a 1:6 dos veces por semana. El medio se cambia cada 3 a 4 días.

Protocolo de análisis

- Las células se siembran a 4000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivan durante 48 a 72 horas hasta una confluencia de 50%. Las células se cambian a medio libre de suero a 100 µl/pocillo. Después de la incubación durante 48-72 horas, se añaden al pocillo el suero y/o los agentes terapéuticos de la presente invención (p. ej., proteínas de albúmina de fusión de la invención y fragmentos y variantes de las mismas). La incubación continúa durante 36 horas adicionales. Se diluye [³H]-timidina (5-20 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia, Núm. TRK120) a 1 microCurie/5 microlitros. Después de la incubación durante 36 horas, se añaden 5 microlitros por pocillo durante 24 horas adicionales. La reacción se termina lavando las células suavemente con solución salina tamponada con fosfato, "PBS", una vez. Las células se fijan con 100 microlitros de TCA enfriado con hielo al 10% durante 15 min a 4°C. El PBS se retira y se añaden 200 microlitros de NaOH 0,2 N. Las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. La solución se transfiere a un vial de centelleo y se añaden 5 mL de líquido de centelleo compatible con soluciones acuosas y se mezcla vigorosamente. Los viales se cuentan en un contador de centelleo beta. Como control negativo, se utiliza sólo tampón. Como control positivo se utiliza suero de ternera fetal.

Ejemplo 15: Análisis de la glucosuria.

- La glucosuria (es decir, el exceso de azúcar en la orina), se puede analizar fácilmente para proporcionar un índice del estado de enfermedad de la diabetes mellitus. El exceso de orina en una muestra del paciente en comparación con una muestra normal paciente es sintomático de DMID y DMNID. La eficacia del tratamiento de un tal paciente que tiene IDDM y DMNID se indica por una disminución resultante en la cantidad de exceso de glucosa en la orina. En una realización preferida para el seguimiento de la DMID y la DMNID, se analizan muestras de orina de los pacientes para determinar la presencia de de glucosa utilizando mecanismos conocidos en la técnica. La glucosuria en los seres humanos se define por una concentración de glucosa urinaria superior a 100 mg por 100 mL. El exceso de los niveles de azúcar en aquellos pacientes que presentan glucosuria se pueden medir con mayor precisión mediante la obtención de muestras de sangre y analizando la glucosa en suero.

Ejemplo 16: Ensayos de detección de la estimulación o inhibición de la proliferación y diferenciación de Células B

- La generación de respuestas inmunitarias humorales funcionales requiere la señalización tanto soluble como cognada entre las células de linaje B y su microentorno. Las señales pueden conferir un estímulo positivo que permite que una célula de linaje B continúe su desarrollo programado, o un estímulo negativo que indica que la célula detiene su ruta de desarrollo actual. Hasta la fecha, se han encontrado numerosas señales estimuladoras e inhibitoras que influyen en la capacidad de respuesta de las células B incluyendo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-14 e IL- 15. Curiosamente, estas señales son por sí mismas efectores débiles pero pueden, combinadas con diferentes proteínas co-estimuladoras, inducir la activación, proliferación, diferenciación, alojamiento, tolerancia y

muerte entre las poblaciones de células B.

Una de las clases más estudiadas de proteínas co-estimuladoras de células B es la superfamilia de TNF. Dentro de esta familia se ha encontrado que CD40, CD27, y CD30 junto con sus respectivos ligandos CD154, CD70, y CD153 regulan una variedad de respuestas inmunitarias. Los análisis que permiten la detección y/o la observación de la proliferación y diferenciación de estas poblaciones de células B y sus precursores son herramientas valiosas en la determinación de los efectos que diferentes proteínas pueden tener en estas poblaciones de células B en términos de proliferación y diferenciación. A continuación se enumeran dos análisis diseñados para permitir la detección de la diferenciación, proliferación, o la inhibición de poblaciones de células B y sus precursores.

Análisis *in vitro* - las proteínas de fusión de albúmina de la invención (incluyendo proteínas de fusión que contienen fragmentos o variantes de proteínas terapéuticas y/o albúmina o fragmentos o variantes de albúmina) se pueden evaluar para determinar su capacidad para inducir la activación, la proliferación, la diferenciación o la inhibición y/o la muerte en las poblaciones de células B y sus precursores. La actividad de una proteína de fusión de albúmina de la invención en las células B de amígdalas humanas purificadas, medida cualitativamente a lo largo del intervalo de dosis de 0,1 a 10.000 ng/mL, se evalúa en un análisis de co-estimulación de linfocitos B convencional en el que las células B de las amígdalas purificadas se cultivan en presencia de cualquiera de *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) fijado con formalina o anticuerpo anti-IgM humana inmovilizado como agente de cebado. Las segundas señales, tales como IL-2 e IL-15 ejercen sinergia con entrecruzamiento de SAC e IgM para provocar la proliferación de células B, medida por la incorporación de timidina tritiada. Los agentes que ejercen sinergia novedosos se pueden identificar fácilmente utilizando este análisis. El análisis implica el aislamiento de células B humanas de las amígdalas mediante agotamiento de cuentas magnéticas (MACS) de células positivas para CD3. La población de células resultante es mayor que 95% de células B según se evaluó mediante la expresión de CD45R (B220).

Se colocan varias diluciones de cada muestra en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos a los que se añaden 10^5 células B en suspensión en medio de cultivo (RPMI 1640 que contiene FBS al 10%, $2 \text{ ME } 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 100 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomycin, y dilución 10^{-5} de SAC) en un volumen total de 150 µl. La proliferación o inhibición se cuantifica mediante un pulso de 20 h (1 uCi/pocillo) con ^3H -timidina (6,7 Ci/mM) empezando 72h después de la adición del factor. Los controles positivos y negativos son IL2 y medio respectivamente.

Análisis *in vivo* - A ratones BALB/c se les inyectan (i.p.) dos veces al día tampón solamente, o 2 mg/Kg de una proteína de fusión de albúmina de la invención (incluyendo las proteínas de fusión que contienen fragmentos o variantes de proteínas terapéuticas y/o albúmina o fragmentos o variantes de albúmina). Los ratones reciben este tratamiento durante 4 días consecutivos, momento en el cual se sacrifican y se recogen para su análisis diversos tejidos y suero. La comparación de secciones H y E de bazo normales y bazo tratados con la proteína de fusión de albúmina de la invención identifican los resultados de la actividad de la proteína de fusión en células de bazo, tales como la difusión de vainas linfáticas peri-arteriales, y/o un aumento significativo en la celularidad nucleada de las regiones de pulpa roja, lo que puede indicar la activación de la diferenciación y proliferación de poblaciones de células B. Los estudios inmunohistoquímicos utilizando un marcador de células B, anti-CD45R(B220), se utilizan para determinar si cualquier cambio fisiológico de las células del bazo, tal como la desorganización esplénica, se deben al aumento de representación de células B dentro de las zonas de células B vagamente definidas que infiltran regiones de células T.

Los análisis de citometría de flujo de los bazo de ratones tratados con la proteína de fusión de albúmina se utilizan para indicar si la proteína de fusión de albúmina aumenta específicamente la proporción de células B ThB+, CD45R(B220) mates por encima de la que se observa en los ratones de control.

Asimismo, una consecuencia predicha del aumento de representación de células B maduras *in vivo* es un aumento relativo en los títulos séricos de Ig. Por consiguiente, los niveles de IgM e IgA en suero se comparan entre los ratones tratados con tampón y proteína de fusión.

Ejemplo 17: Análisis de proliferación de células T

Se realiza un análisis de proliferación inducida por CD3 en PBMC y se mide por la captación de ^3H -timidina. El análisis se realiza de la siguiente manera. Se recubren placas de noventa y seis pocillos con 100 µl/pocillo de mAb contra CD3 (HIT3a, Pharmingen) o mAb de control de isotipo (B33.1) durante una noche a 4 grados Celsius (1 µg/mL en tampón de bicarbonato 0,05 M, pH 9,5), después se lavan tres veces con PBS. Las PBMC se aíslan mediante centrifugación en gradiente F/H a partir de sangre periférica humana y se añaden a pocillos por cuadruplicado (5×10^4 /pocillo) de placas recubiertas con mAb en medio RPMI que contiene FCS al 10% y P/S en presencia de concentraciones variables de una proteína de fusión de albúmina de la invención (incluyendo proteínas de fusión que contienen fragmentos o variantes de proteínas terapéuticas y/o la albúmina o fragmentos o variantes de albúmina) (volumen total de 200 µl). El tampón de proteína relevante y el medio solo son los controles. Después de 48 horas de cultivo a 37 grados Celsius, las placas se centrifugan durante 2 min. a 1000 rpm y se retiran 100 µl de sobrenadante y se almacenan -20 grados Celsius para medir la IL-2 (u otras citoquinas) si se observa efecto sobre la proliferación. Los pocillos se complementan con 100 µl de medio que contiene 0,5 uCi de ^3H -timidina y se cultivan a 37 grados Celsius durante 18-24 horas. Los pocillos se cosechan y la incorporación de ^3H -timidina se

utiliza como una medida de la proliferación. Anti-CD3 solo es el control positivo para la proliferación. La IL-2 (100 U/ml) también se utiliza como un control que potencia la proliferación. El anticuerpo de control que no induce proliferación de células T se utiliza como el control negativo para los efectos de las proteínas de fusión de la invención.

5 Ejemplo 18: Efecto de las proteínas de fusión de la invención sobre la expresión de MHC de clase II, moléculas coestimuladoras y de adherencia y diferenciación celular de monocitos y células dendríticas humanas derivadas de monocitos

Las células dendríticas se generan por la expansión de la proliferación de precursores que se encuentran en la sangre periférica: se cultivan PBMC adherentes o fracciones monocíticas elutriadas durante 7-10 días con GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (20 ng/ml). Estas células dendríticas tienen el fenotipo característico de células inmaduras (expresión de antígenos CD1, CD80, CD86, CD40 y MHC de clase II). El tratamiento con factores de activación, tales como TNF- α , provoca un rápido cambio en el fenotipo de la superficie (aumento de la expresión de MHC de clase I y II, moléculas coestimuladoras y de adherencia, regulación a la baja de FCyRII, regulación al alza de CD83). Estos cambios se correlacionan con un aumento de la capacidad presentadora de antígenos y con la maduración funcional de las células dendríticas.

El análisis FACS de los antígenos de superficie se realiza de la siguiente manera. Las células se tratan 1-3 días con concentraciones crecientes de una proteína de fusión de albúmina de la invención o LPS (control positivo), se lavan con PBS que contiene BSA al 1% y azida de sodio 0,02 mM, y a continuación se incuban con dilución 1:20 de anticuerpos monoclonales marcados con FITC o PE apropiados durante 30 minutos a 4 grados Celsius. Después de un lavado adicional, las células marcadas se analizan mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson).

Efecto sobre la producción de citoquinas. Las citoquinas generadas por las células dendríticas, en particular, IL-12, son importantes en el inicio de las respuestas inmunitarias dependientes de células T. La IL-12 influye fuertemente en el desarrollo de la respuesta inmunitaria de células T colaboradoras Th1, e induce la función de las células T y NK citotóxicas. Un ELISA se utiliza para medir la liberación de IL-12 de la siguiente manera. Las células dendríticas (10^6 /ml) se tratan con concentraciones crecientes de una proteína de fusión de albúmina de la invención durante 24 horas. Se añaden LPS (100 ng/ml) al cultivo celular como control positivo. Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogen a continuación y se analizan para determinar el contenido de IL-12 utilizando el kit de ELISA comercial (p. ej., R & D Systems (Minneapolis, MN)). Se utilizan los protocolos convencionales proporcionados con los kits.

Efecto sobre la expresión de MHC de clase II, moléculas coestimuladoras y de adherencia. Se pueden identificar en los monocitos tres grandes familias de antígenos de superficie celular: moléculas de adherencia, moléculas implicadas en la presentación de antígenos, y receptor de Fc. La modulación de la expresión de antígenos del MHC de clase II y otras moléculas coestimuladoras, tales como B7 e ICAM-I, puede dar como resultado cambios en la capacidad presentadora de antígeno de los monocitos y la capacidad de inducir la activación de células T. El aumento de expresión de receptores de Fc se puede correlacionar con la mejora de la actividad citotóxica de los monocitos, la liberación de citoquinas y la fagocitosis.

El análisis FACS se utiliza para examinar los antígenos de superficie de la siguiente manera. Los monocitos son tratados 1-5 días con concentraciones crecientes de una proteína de fusión de albúmina de la invención o LPS (control positivo), se lavan con PBS que contiene BSA al 1% y azida de sodio 0,02 mM, y después se incuban con dilución 1:20 de anticuerpos monoclonales marcados con FITC o PE apropiados durante 30 minutos a 4 grados Celsius. Después de un lavado adicional, las células marcadas se analizan mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson).

Activación de monocitos y/o aumento de la supervivencia. Los análisis para moléculas que activan (o alternativamente, inactivan) monocitos y/o aumentan la supervivencia de monocitos (o alternativamente, disminuyen la supervivencia de monocitos) son conocidos en la técnica y pueden aplicarse rutinariamente para determinar si una molécula de la invención funciona como inhibidor o activador de monocitos. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden seleccionar utilizando los tres análisis descritos a continuación. Para cada uno de estos análisis, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se purifican a partir de leukopacks de donantes individuales (Cruz Roja Americana, Baltimore, MD) mediante centrifugación a través de un gradiente Histopaque (Sigma). Los monocitos se aíslan a partir de PBMC por elutriación centrífuga a contracorriente.

Ensayo de Supervivencia de monocitos. Los monocitos de sangre periférica humana pierden progresivamente la viabilidad cuando se cultivan en ausencia de suero u otros estímulos. Su muerte resulta de procesos regulados internamente (apoptosis). La adición al cultivo de factores activadores, tales como TNF- α mejora drásticamente la supervivencia celular y previene la fragmentación del ADN. Se utiliza tinción con yoduro de propidio (PI) para medir la apoptosis de la siguiente manera. Los monocitos se cultivan durante 48 horas en tubos de polipropileno en medio libre de suero (control positivo), en presencia de 100 ng/mL de TNF- α (control negativo), y en presencia de concentraciones variables de la proteína de fusión que se va a someter a ensayo. Las células se suspenden a una concentración de 2×10^6 /ml en PBS que contiene PI a una concentración final de 5 μ g/mL, y a continuación se

incubaban a temperatura ambiente durante 5 minutos antes del análisis FACScan. Se ha demostrado que la captación de PI se correlaciona con la fragmentación de ADN en este paradigma experimental.

Efecto sobre la liberación de citoquinas. Una función importante de los monocitos/macrófagos es su actividad reguladora sobre otras poblaciones celulares del sistema inmunitario a través de la liberación de citoquinas después de la estimulación. Un ELISA para medir la liberación de citoquinas se realiza de la siguiente manera. Se incuban monocitos humanos a una densidad de 5×10^5 células/mL con concentraciones crecientes de una proteína de fusión de albúmina de la invención y en las mismas condiciones, pero en ausencia de la proteína de fusión. Para la producción de IL-12, las células se ceban durante la noche con IFN (100 U/ml) en presencia de la proteína de fusión. A continuación se añade LPS (10 ng/ml). Los medios condicionados se recogen después de 24 horas y se mantienen congeladas hasta su uso. La medición de TNF-alfa, IL-10, MCP-1 e IL-8 se realiza a continuación utilizando un kit de ELISA disponible en el mercado (p. ej., R & D Systems (Minneapolis, MN)) y aplicando los protocolos convencionales proporcionados con el kit.

Explosión oxidativa. Los monocitos purificados se siembran en placas de 96 pocillos a 2×10^5 células/pocillo. Se añaden a los pocillos concentraciones crecientes de una proteína de fusión de albúmina de la invención en un volumen total de medio de cultivo 0,2 mL (RPMI 1640 + FCS al 10%, glutamina y antibióticos). Después de 3 días de incubación, las placas se centrifugan y se retira el medio de los pocillos. A las monocapas de macrófagos, se les añaden 0,2 mL por pocillo de solución de rojo fenol (NaCl 140 mM, tampón de fosfato potásico 10 mM pH 7,0, dextrosa 5,5 mM, rojo fenol 0,56 mM y 19 U/mL de HRPO), junto con el estimulador (PMA 200 nM). Las placas se incuban a 37°C durante 2 horas y la reacción se detiene añadiendo 20 µl de NaOH 1 N por pocillo. La absorbancia se lee a 610 nm. Para calcular la cantidad de H_2O_2 producido por los macrófagos, se realiza una curva patrón de una solución de H_2O_2 de molaridad conocida para cada experimento.

Ejemplo 19: Efecto de las proteínas de fusión albúmina de la invención sobre el crecimiento de las células endoteliales vasculares

En el día 1, se siembran células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) a 2×10^4 células/35 mm de densidad de placa en medio M199 que contiene suero bovino fetal (FBS) al 4%, 16 unidades/mL de heparina y 50 unidades/mL de suplementos de crecimiento de células endoteliales (ECG, Biotechnology, Inc.). El día 2, el medio se sustituye por M199 que contiene FBS al 10%, 8 unidades/mL de heparina. Se añaden una proteína de fusión de albúmina de la invención, y controles positivos, tales como VEGF y FGF básico (bFGF), a concentraciones variables. Los días 4 y 6, se sustituye el medio. El día 8, se determina el número de células con un contador Coulter.

Un aumento del número de células HUVEC indica que la proteína de fusión puede hacer proliferar las células endoteliales vasculares, mientras que una disminución del número de células HUVEC indica que la proteína de fusión inhibe las células endoteliales vasculares.

Ejemplo 20: Modelo de cicatrización de herida corneal de Rata

Este modelo animal muestra el efecto de una proteína de fusión de albúmina de la invención sobre la neovascularización. El protocolo experimental incluye:

Realización de una incisión larga 1-1,5 mm desde el centro de la córnea en la capa estromal.

Inserción de una espátula por debajo del labio de la incisión frente a la esquina exterior del ojo.

Preparar un bolsillo (su base es de 1-1,5 mm desde el borde del ojo).

Colocación de una pastilla, que contiene 50 ng- 5 µg de una proteína de fusión de albúmina de la invención, dentro del bolsillo.

También se puede aplicar tratamiento con una proteína de fusión de albúmina de la invención tópicamente a las heridas de la córnea en un intervalo de dosificación de 20 mg - 500 mg (tratamiento diario durante cinco días).

Ejemplo 21: Modelos de ratón diabético y de cicatrización de heridas alterada por glucocorticoides

Modelo de ratón diabético db+/db+

Para demostrar que una proteína de fusión de albúmina de la invención acelera el proceso de cicatrización, se utiliza el modelo de ratón genéticamente diabético de cicatrización de heridas. El modelo de cicatrización de herida en todo su espesor en el ratón db+/db+ es un modelo bien caracterizado, clínicamente relevante y reproducible de cicatrización alterada de heridas. La curación de la herida diabética depende de la formación de tejido de granulación y reepitelización en lugar de contracción (Gartner, M.H. et al., J. Surg Res 52:389 (1992); Greenhalgh, D.G. et al., Am J. Pathol. 756:1235 (1990)).

Los animales diabéticos tienen muchos de los rasgos característicos observados en la diabetes mellitus tipo II. Los ratones (db+/db+) homocigotos son obesos en comparación con sus hermanos de camada heterocigotos (db+/+m) normales. Los ratones diabéticos (db+/db+) mutantes tienen una sola mutación recesiva autosómica en el

cromosoma 4 (db+) (Coleman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:283-293 (1982)). Los animales muestran polifagia, polidipsia y poliuria. Los ratones diabéticos (db+/db+) mutantes tienen alta glucosa en sangre, niveles de insulina elevados o normales, e inmunidad mediada por células suprimida (Mandel et al., J. Immunol. 120:1375 (1978); Debray-Sachs, M. et al., Clin. Exp. Immunol. 51(1):1-7 (1983); Leiter et al., Am J. Pathol. 114:46-55 (1985)). En estos animales se han descrito neuropatía periférica, complicaciones miocárdicas y lesiones microvasculares, engrosamiento de la membrana basal y anomalías en la filtración glomerular (Norido, F. et al., Exp Neurol 83(2):221-232 (1984); Robertson et al., Diabetes 29(1):60-67 (1980); Giacomelli et al., Lab Invest 40(4):460-473 (1979); Coleman, D.L., Diabetes 31 (Supl): 1-6 (1982)). Estos ratones diabéticos homocigotos desarrollan hiperglucemia que es resistente a los análogos de insulina para la diabetes de tipo II humana (Mandel et al., J. Immunol 720:1375-1377 (1978)).

Las características observadas en estos animales sugieren que la cicatrización en este modelo puede ser similar a la cicatrización observada en la diabetes humana (Greenhalgh, et al., Am. J. of Pathol. 755:1235-1246 (1990)).

En este estudio se utilizan ratones hembra C57BL/KsJ (db+/db+) genéticamente diabéticos y sus hermanos de camada heterocigotos (db+/+m) no diabéticos (Jackson Laboratories). Los animales se adquieren a las 6 semanas de edad y tienen 8 semanas de edad al inicio del estudio. Los animales se alojan individualmente y reciben comida y agua ad libitum. Todas las manipulaciones se realizan utilizando técnicas asépticas. Los experimentos se llevan a cabo de acuerdo con las normas y directrices de Human Genome Sciences, Inc. Comité Institucional para Cuidado y Uso de Animales y las Directrices para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

El protocolo de laceración se lleva a cabo de acuerdo con métodos previamente referidos (Tsuboi, R. y Rifkin, D.B., J. Exp. Med. 172:245-251 (1990)). En resumen, en el día de la laceración, los animales se anestesian con una inyección intraperitoneal de Avertin (0,01 mg/ml), 2,2,2-tribromoetanol y 2-metil-2-butanol disueltos en agua desionizada. La región dorsal del animal se afeita y la piel se lava con solución de etanol del 70% y yodo. El área quirúrgica se seca con gasa estéril antes de la herida. A continuación se crea una herida de un espesor total de 8 mm, utilizando un bisturí circular Keyes. Inmediatamente después de la laceración, la piel circundante se estira suavemente para eliminar la expansión de la herida. Las heridas se dejan abiertas durante la duración del experimento. La aplicación del tratamiento se administra por vía tópica durante 5 días consecutivos comenzando el día de la herida. Antes del tratamiento, las heridas se limpian suavemente con solución salina y esponjas de gasa estéril.

Las heridas se examinan visualmente y se fotografían a una distancia fija el día de la cirugía y a intervalos de dos días después de eso. El cierre de la herida se determina midiendo diariamente los días 1-5 y el día 8. Las heridas se miden horizontal y verticalmente utilizando un calibrador Jameson calibrado. Se consideran heridas cicatrizadas si el tejido de granulación ya no es visible y la herida está cubierta por un epitelio continuo.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención se administra utilizando un intervalo de dosis diferentes, de 4 mg a 500 mg por herida por día durante 8 días en vehículo. Los grupos de control reciben 50 mL de solución de vehículo.

Los animales se sacrifican el día 8 con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (300 mg/kg). Las heridas y la piel circundante se recogen a continuación para la histología e inmunohistoquímica. Las muestras de tejido se colocan en formalina tamponada neutra al 10% en bandejas de tejido entre esponjas de biopsia para su posterior procesamiento.

Se evalúan tres grupos de 10 animales cada uno (5 controles diabéticos y 5 no diabéticos): 1) Control de placebo con vehículo, 2) grupo no tratado y 3) grupo tratado.

El cierre de la herida se analiza midiendo el área en el eje vertical y horizontal y obteniendo el área cuadrada total de la herida. La contracción se estima a continuación estableciendo las diferencias entre la superficie de la herida inicial (día 0) y la de después del tratamiento (día 8). El área de la herida el día 1 es de 64 mm², el tamaño correspondiente al perforador dérmico. Los cálculos se realizan utilizando la fórmula siguiente:

a. [Área abierta el día 8] - [Área abierta el día 1]/[Área abierta el día 1]

Las muestras se fijan en formalina al 10% y los bloques incluidos en parafina se seccionan perpendicularmente a la superficie de la herida (5 mm) y se cortan utilizando un microtomo Reichert-Jung. Se realiza la tinción de hematoxilina-eosina (H y E) de rutina en las secciones transversales de las heridas bisecadas. El examen histológico de las heridas se utiliza para valorar si el proceso de curación y la apariencia morfológica de la piel reparada se alteran mediante el tratamiento con una proteína de fusión de albúmina de la invención. Esta evaluación incluye la verificación de la presencia de acumulación celular, células inflamatorias, capilares, fibroblastos, reepitelización y madurez epidérmica (Greenhalgh, D.G. et al., Am. J. Pathol. 136:1235 (1990)). Un micrómetro óptico calibrado es utilizado por un observador ciego.

Las secciones de tejido también se tiñen inmunohistoquímicamente con un anticuerpo anti-queratina humana policlonal de conejo utilizando el sistema de detección ABC Elite. La piel humana se utiliza como un control de tejido positivo mientras que se utiliza IgG no inmune como un control negativo. El crecimiento de queratinocitos se

determina evaluando el grado de reepitelización de la herida utilizando un micrómetro óptico calibrado.

El antígeno nuclear de células en proliferación/ciclina (PCNA) en muestras de piel se demuestra mediante el uso de anticuerpos anti-PCNA (1:50) con un sistema de detección ABC Elite. El cáncer de colon humano sirve como control de tejido positivo y el tejido cerebral humano se utiliza como control de tejido negativo. Cada muestra incluye una sección con omisión del anticuerpo primario y sustitución por IgG de ratón no inmune. La clasificación de estas secciones se basa en el grado de proliferación en una escala de 0-8, reflejando el lado inferior de la escala ligera proliferación y reflejando el lado superior proliferación intensa.

Los datos experimentales se analizan mediante una prueba t no pareada. Un valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

10 **Modelo de rata alterado por esteroides**

La inhibición de la cicatrización de heridas por esteroides ha sido bien documentada en diversos sistemas *in vitro* e *in vivo* (Wahl, Glucocorticoids and Wound healing. en: Anti-Inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects. 280-302 (1989); Wahlet al., J. Immunol. 115: 476-481 (1975); Werb et al., J. Exp. Med. 147:1684-1694 (1978)). Los glucocorticoides retardan la cicatrización de heridas mediante la inhibición de la angiogénesis, disminuyendo la permeabilidad vascular (Ebert et al., An. Intern. Med. 37:701-705 (1952)), la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno (Beck et al., Growth Factors. 5: 295-304 (1991); Haynes et al., J. Clin. Invest. 61: 703-797 (1978)) y produciendo una reducción transitoria de los monocitos circulantes (Haynes et al., J. Clin. Invest. 61: 703-797 (1978); Wahl, "Glucocorticoids and wound healing", En: Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, págs. 280-302 (1989)). La administración sistémica de esteroides a la cicatrización de heridas alterada es un fenómeno bien establecido en ratas (Beck et al., Growth Factors. 5: 295-304 (1991); Haynes et al., J. Clin. Invest. 61:703-797 (1978); Wahl, "Glucocorticoids and wound healing", En: Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, págs. 280-302 (1989); Pierce et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2229-2233 (1989)).

Para demostrar que una proteína de fusión de albúmina de la invención puede acelerar el proceso de cicatrización, se evalúan los efectos de múltiples aplicaciones tópicas de la proteína de fusión en heridas de la piel por escisión de espesor total en ratas en las que la curación ha sido alterada por la administración sistémica de metilprednisolona.

En este ejemplo se utilizan ratas Sprague Dawley macho adultas jóvenes con un peso de 250-300 g (Charles River Laboratories). Los animales se adquieren a las 8 semanas de edad y tienen 9 semanas de edad al inicio del estudio. La respuesta de curación de las ratas se altera por la administración sistémica de metilprednisolona (17 mg/kg/rata por vía intramuscular) en el momento de la laceración. Los animales se alojan individualmente y reciben comida y agua ad libitum. Todas las manipulaciones se realizan utilizando técnicas asépticas. Este estudio se lleva a cabo de acuerdo con las normas y directrices de Human Genome Sciences, Inc. Comité Institucional para Cuidado y Uso de Animales y las Directrices para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

El protocolo de laceración se sigue de acuerdo el descrito anteriormente. En el día de la laceración, los animales se anestesian con una inyección intramuscular de cetamina (50 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg). La región dorsal del animal se afeita y la piel se lava con etanol del 70% y soluciones de yodo. La zona quirúrgica se seca con gasa estéril antes de la laceración. Se crea una herida de un grosor total de 8 mm utilizando un bisturí circular Keyes. Las heridas se dejan abiertas durante la duración del experimento. Las aplicaciones de los materiales de ensayo se proporcionan por vía tópica una vez al día durante 7 días consecutivos comenzando en el día de la herida y posteriormente a la administración de metilprednisolona. Antes del tratamiento, las heridas se limpian suavemente con solución salina y esponjas de gasa estéril.

Las heridas se examinan visualmente y se fotografían a una distancia fija el día de la herida y al final del tratamiento. El cierre de la herida se determina midiendo diariamente los días 1-5 y el día 8. Las heridas se miden horizontal y verticalmente utilizando un calibrador Jameson calibrado. Las heridas se consideran cicatrizadas si el tejido de granulación ya no es visible y la herida está cubierta por un epitelio continuo.

La proteína de fusión de la invención se administra utilizando un intervalo de dosis diferentes, de 4 mg a 500 mg por herida por día durante 8 días en vehículo. Los grupos de control reciben 50 mL de solución de vehículo.

Los animales se sacrifican el día 8 con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (300 mg/kg). Las heridas y la piel circundante se recogen a continuación para la histología. Las muestras de tejido se colocan en formalina tamponada neutra al 10% en bandejas de tejido entre esponjas de biopsia para su procesamiento adicional.

Se evalúan tres grupos de 10 animales cada uno (5 con metilprednisolona y 5 sin glucocorticoides): 1) Grupo sin tratamiento 2) Control de placebo con vehículo 3) Grupos tratados.

El cierre de la herida se analiza midiendo el área en el eje vertical y horizontal y obteniendo la superficie total de la herida. El cierre se estima a continuación mediante el establecimiento de las diferencias entre la superficie de la herida inicial (día 0) y la de después del tratamiento (día 8). El área de la herida el día 1 es 64 mm^2 , el tamaño

correspondiente al perforador dérmico. Los cálculos se realizan utilizando la fórmula siguiente:

b. [Área abierta el día 8] - [Área abierta el día 1]/[área abierta el día 1]

Los especímenes se fijan en formalina al 10% y los bloques incluidos en parafina se seccionan perpendicularmente a la superficie de la herida (5 mm) y se cortan utilizando un micrótopo Olympus. Se realiza tinción de hematoxilina-eosina (H y E) de rutina en las secciones transversales de las heridas bisecadas. El examen histológico de las heridas permite la evaluación de si el proceso de curación y la apariencia morfológica de la piel reparada se mejoran mediante el tratamiento con una proteína de fusión de albúmina de la invención. Un micrómetro óptico calibrado es utilizado por un observador ciego para determinar la distancia del hueco de la herida.

Los datos experimentales se analizan mediante una prueba t no pareada. Un valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

Ejemplo 22: Modelo de linfedema animal

El propósito de este enfoque experimental es crear un modelo de linfedema apropiado y compatible para someter a ensayo de los efectos terapéuticos de una proteína de fusión de albúmina de la invención en la linfangiogénesis y el reestablecimiento del sistema circulatorio linfático en la extremidad trasera de la rata. La eficacia se mide mediante el volumen de hinchazón de la extremidad afectada, la cuantificación de la cantidad de vasculatura linfática, la proteína en plasma sanguíneo total, y la histopatología. Se observa linfedema agudo durante 7-10 días. Quizás lo más importante, el progreso crónico del edema es seguido durante hasta 3-4 semanas.

Antes de comenzar la cirugía, se toman muestras de sangre para el análisis de la concentración de proteínas. A ratas macho que pesan aproximadamente 350 g ~ se les aplican dosis de pentobarbital. Posteriormente, las patas derechas se afeitan desde la rodilla hasta la cadera. La zona afeitada se limpia con una gasa empapada en EtOH del 70%. Se extrae sangre para el ensayo de la proteína total en suero. Se realizan mediciones de la circunferencia y volumétricas antes de inyectar un colorante en las patas después de marcar 2 niveles de medida (0,5 cm por encima del talón, en pt-medio de la pata dorsal). Al dorso intradérmico de ambas patas derecha e izquierda se le inyectan 0,05 mL de azul de Evan al 1%. A continuación se realizan mediciones de la circunferencia y volumétricas después de la inyección de un colorante en las patas.

Utilizando la articulación de la rodilla como un punto de referencia, se realiza circunferencialmente una incisión inguinal a mitad de la pata lo que permite localizar los vasos femorales. Se utilizan fórceps y pinzas para diseccionar y separar los colgajos cutáneos. Después de localizar los vasos femorales, se localiza el vaso linfático que corre a lo largo de lado y por debajo de los vasos. Los vasos linfáticos principales en esta zona son a continuación coagulados eléctricamente o ligados con sutura.

Utilizando un microscopio, se realiza una disección roma de los músculos de parte trasera de la pierna (cerca del semitendinoso y aductores). A continuación se localiza el ganglio linfático poplíteo. A continuación se ligan mediante sutura los 2 vasos linfáticos proximales y los 2 distales y el suministro sanguíneo distal del ganglio poplíteo. A continuación se elimina el ganglio linfático poplíteo y cualquier tejido adiposo acompañante, cortando los tejidos conectivos.

Hay que tener cuidado para controlar cualquier leve hemorragia resultante de este procedimiento. Después se ocuyen los vasos linfáticos, los colgajos cutáneos se sellan utilizando piel líquida (Vetbond) (AJ Buck). Los bordes de la piel separados se sellan al tejido muscular subyacente mientras que se deja un hueco de ~0,5 cm alrededor de la pierna. La piel también se puede anclar mediante sutura al músculo subyacente cuando sea necesario.

Para evitar la infección, los animales se alojan individualmente con una malla (sin lecho). Los animales que se recuperan se comprueban todos los días a través del pico edematoso óptimo, que se produce típicamente sobre el día 5-7. A continuación se observa el pico edematoso meseta. Para evaluar la intensidad del linfedema, se miden la circunferencia y 2 volúmenes de los lugares designados en cada pata antes de la operación y diariamente durante 7 días. Se determina el efecto de las proteínas plasmáticas durante el linfedema y también se investiga si el análisis de proteínas es un parámetro de ensayo útil. Los pesos de las extremidades, tanto de control como edematosas son evaluados en 2 lugares. El análisis se realiza de una manera ciega.

Mediciones de la circunferencia: Bajo una breve anestesia con gas para evitar el movimiento de las extremidades, se utiliza una cinta de tela para medir la circunferencia de la extremidad. Las mediciones se realizan en el hueso del tobillo y la pata dorsal por 2 personas diferentes y esas 2 lecturas se promedian. Las lecturas se toman tanto de las extremidades de control como edematosas.

Mediciones volumétricas: El día de la cirugía, los animales se anestesian con Pentobarbital y se someten a ensayo antes de la cirugía. Para la volumetría diarias los animales están bajo una breve anestesia con halotano (inmovilización rápida y recuperación rápida), y ambas patas se afeitan y se marcan igualmente utilizando marcador indeleble en las patas. Las patas se sumergen primero en agua, a continuación se sumergen en el aparato hasta cada nivel marcado y a continuación se miden mediante el soporte lógico de edema Buxco (Chen/Victor). Los datos son registrados por una persona, mientras que la otra está sumergiendo la extremidad hasta la zona marcada.

Mediciones de proteína de plasma sanguíneo: La sangre se extrae, se centrifuga, y se separa el suero antes de la cirugía y después a la conclusión de la comparación de proteína total y Ca^{2+} .

Comparación del Peso de las Extremidades: Después de la extracción de sangre, el animal se prepara para la recogida de tejidos. Las extremidades se amputan utilizando una guillotina, a continuación, las patas tanto experimentales como de control se cortan en la ligadura y se pesan. Se realiza un segundo pesaje a medida que la articulación tibio-calcaneal es desarticulada y se pesa el pie.

Preparaciones histológicas: El músculo transversal situado detrás de la zona de la rodilla (poplíteo) se diseca y se disponen en un molde metálico, se carga de Gel congelado, se sumerge en metilbutano frío, se coloca en bolsas de muestra marcadas a -80°C hasta el corte. Tras el corte, el músculo se observa bajo microscopio fluorescente para vasos linfáticos.

Ejemplo 23: Supresión de la expresión de moléculas de adherencia inducida por TNF alfa mediante una proteína de fusión de albúmina de la invención

El reclutamiento de linfocitos a las zonas de inflamación y angiogénesis implica interacciones receptor-ligando específicas entre moléculas de adherencia de la superficie celular (CAM) en los linfocitos y el endotelio vascular. El proceso de adherencia, tanto en entornos normales como patológicos, sigue una cascada de múltiples etapas que implica la expresión de la molécula de adherencia intercelular 1 (ICAM-1), de la molécula de adherencia de células vasculares 1 (VCAM-I), y de la molécula de adherencia de leucocitos endoteliales 1 (E-selectina) en las células endoteliales (CE). La expresión de estas moléculas y otras en el endotelio vascular determina la eficacia con que los leucocitos se pueden adherir a la vasculatura local y extravasarse al tejido local durante el desarrollo de una respuesta inflamatoria. La concentración local de citoquinas y factor de crecimiento participa en la modulación de la expresión de estas CAM.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), una potente citoquina proinflamatoria, es un estimulador de las tres CAM sobre las células endoteliales y puede estar implicado en una amplia variedad de respuestas inflamatorias, que a menudo dan lugar a un resultado patológico.

Se puede examinar el potencial de una proteína de fusión de albúmina de la invención para mediar la supresión de TNF- α inducida por la expresión de CAM. Se emplea un ensayo de ELISA modificado que usa las CE como un absorbente de fase sólida para medir la cantidad de expresión de CAM en CE tratadas con TNF- α cuando se co-estimulan con un miembro de la familia FGF de proteínas.

Para realizar el experimento, se obtienen cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) a partir de cosechas de cordón agrupadas y se mantienen en medio de crecimiento (EGM-2; Clonetics, San Diego, CA) con un suplemento de FCS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1% en una incubadora humidificada a 37 grados Celsius que contiene CO_2 al 5%. Las HUVEC se siembran en placas de 96 pocillos a concentraciones de 1×10^4 células/pocillo en medio EGM a 37 grados Celsius durante 18-24 horas o hasta la confluencia. Las monocapas se lavan con posterioridad 3 veces con una solución sin suero de RPMI 1640 con un suplemento de 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina, y se tratan con una citoquina dada y/o factores de crecimiento durante 24 horas a 37 grados Celsius. Después de la incubación, las células se evalúan a continuación para determinar la expresión de CAM.

Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se cultivan en una placa de 96 pocillos convencional hasta la confluencia. El medio de crecimiento se retira de las células y se reemplaza por 90 μL de medio 199 (FBS al 10%). Las muestras para el ensayo y los controles positivos o negativos se agregan a la placa por triplicado (en volúmenes de 10 μL). Las placas se incuban a 37 grados Celsius, ya sea durante 5 h (expresión de selectina y de integrina) o 24 h (sólo expresión de integrina). Las placas se aspiran para eliminar el medio y se añaden 100 μL de paraformaldehído al 0,1%-PBS (con Ca^{++} y Mg^{++}) a cada pocillo. Las placas se mantienen a 4°C durante 30 min.

El fijador se retira a continuación de los pocillos y los pocillos se lavan IX con PBS (+Ca,Mg) + BSA al 0,5% y se drena. No se permite que los pocillos se sequen. Se añaden 10 μL de anticuerpo primario diluido a los pocillos de ensayo y de control. Se utilizan Anti-ICAM-1-Biotina, Anti-VCAM-1-Biotina y Anti-E-selectina-Biotina a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (dilución 1:10 de anticuerpo de partida a 0,1 mg/mL). Las células se incuban a 37°C durante 30 min. En un entorno humidificado. Los pocillos se lavan X3 con PBS (+Ca,Mg) + BSA al 0,5%.

A continuación, se añaden 20 μL de ExtrAvidin-Fosfatasa Alcalina diluida (dilución 1:5000) a cada pocillo y se incuban a 37°C durante 30 min. Los pocillos se lavan X3 con PBS (+Ca,Mg) + BSA al 0,5%. Se disuelve 1 comprimido de fosfato de p-nitrofenol pNPP en 5 mL de tampón de glicina (pH 10,4). Se añaden a cada pocillo de ensayo 100 μL de sustrato de pNPP en tampón glicina. Se preparan pocillos convencionales, por triplicado, a partir de la dilución de trabajo de la ExtrAvidin-Fosfatasa Alcalina en tampón de glicina: $1:5000$ (10^0) $> 10^{-05}$ $> 10^{-1}$ $> 10^{1.5}$. Se añaden 0,5 μL de cada dilución a pocillos por triplicado y el contenido de AP resultante en cada pocillo es de 5,50 ng, 1,74 ng, 0,55 ng, 0,18 ng. A continuación, se deben añadir 100 μL de reactivo pNPP a cada uno de los pocillos convencionales. La placa se debe incubar a 37°C durante 4 h. Se añade un volumen de 50 μL de NaOH 3M a todos los pocillos. Los resultados se cuantifican en un lector de placas a 405 nm. La opción de sustracción del fondo se utiliza en los pocillos de blanco solo cargados con tampón de glicina. El molde se ajusta para indicar la

concentración de producto conjugado de AP en cada pocillo convencional [5,50 ng; 1,74 ng; 0,55 ng; 0,18 ng]. Los resultados se indican como cantidad de producto conjugado de AP unido en cada muestra.

Ejemplo 24: Construcción del constructo informador de GAS

5 Una ruta de transducción de señales implicada en la diferenciación y proliferación de células se denomina ruta Jaks-STAT. Las proteínas activadas en la ruta Jak-STAT se unen a elementos del sitio de activación gamma "GAS" o elemento de respuesta sensible a interferón ("ISRE"), localizado en el promotor de muchos genes. La unión de una proteína a estos elementos altera la expresión del gen asociado.

10 Los elementos GAS e ISRE son reconocidos por una clase de factores de transcripción denominados Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción, o "STAT". Hay seis miembros de la familia STAT. Stat1 y Stat3 están presentes en muchos tipos de células, como lo está Stat2 (puesto que la respuesta a IFN-alfa es generalizada). El Stat4 está más restringido y no se encuentra en muchos tipos de células, aunque se ha encontrado en la clase I de células T colaboradoras, después del tratamiento con IL-12. El Stat5 fue originalmente denominado factor de crecimiento mamario, pero se ha encontrado en concentraciones más altas en otras células, incluyendo células mieloides. Puede ser activado en células de cultivo de tejidos por muchas citoquinas.

15 Los STAT se activan para translocarse desde el citoplasma al núcleo después de la fosforilación de la tirosina mediante un conjunto de quinasas conocidas como la familia de Quinasas Janus ("Jak"). Las Jak representan una familia distinta de tirosina quinasas solubles e incluyen Tyk2, Jak1, Jak2 y Jak3. Estas quinasas exhiben similitud de secuencia significativa y generalmente son catalíticamente inactivas en las células en reposo.

20 Las Jak son activadas por una amplia gama de receptores resumidos en la siguiente Tabla. (Adaptada de la revisión por Schidler y Darnell, Ann Rev. Biochem. 64:621-51 (1995)). Una familia de receptores de citoquina, capaz de activar Jak, se divide en dos grupos: (a) la Clase 1 incluye receptores para IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, Epo, PRL, GH, G-CSF, GM-CSF, LIF, CNTF y trombopoyetina; y (b) la Clase 2 incluye IFN-a, IFN-g, e IL-10. Los receptores de la Clase 1 comparten un motivo conservado de cisteína (un conjunto de cuatro cisteínas conservadas y un triptófano) y un motivo WSXWS (una región de membrana proximal que codifica Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser (SEQ ID NO: 53)).

30 De este modo, durante la unión de un ligando a un receptor, las Jak se activan, lo que a su vez activa los STAT, que a continuación se translocan y se unen a elementos de GAS. Todo este proceso se enmarca en la ruta de transducción de señales Jak-STAT. Por lo tanto, la activación de la ruta de Jaks-STAT, reflejada por la unión del elemento GAS o ISRE, puede usarse para indicar las proteínas implicadas en la proliferación y diferenciación de las células. Por ejemplo, se sabe qué factores de crecimiento y citoquinas activan la ruta Jak-STAT (véase la Tabla 5, a continuación). Por lo tanto, mediante el uso de elementos GAS conectados a moléculas informadoras, se pueden identificar los activadores de la ruta de Jak-STAT.

Tabla 5

Ligando de JAK	tyk2	STATS Jak1	Jak2	Jak3	GAS (elementos) o ISRE	
Familia de IFN						
IFN-a/B	+	+	-	-	1,2,3	ISRE
IFN-g		+	+	-	1	GAS (IRF1>Lys6>IFP)
IL-10	+	?	?	-	1,3	
Familia de g130						
IL-6 (Pleiotrópico)	+	+	+	?	1,3	GAS(IRF1>Lys6>IFP)
IL-11 (Pleiotrópico)	?	+	?	?	1,3	
OnM (Pleiotrópico)	?	+	+	?	1,3	

Ligando de JAK	tyk2	STATS Jak1	Jak2	Jak3	GAS (elementos) o ISRE	
LIF (Pleiotrópico)	?	+	+	?	1,3	
CNTF (Pleiotrópico)	-/+	+	+	?	1,3	
G-CSF (Pleiotrópico)	?	+	?	?	1,3	
IL-12 (Pleiotrópico)	+	-	+	+	1,3	
Familia de g-C						
IL-2 (linfocitos)	-	+	-	+	1,3,5	GAS
IL-4 (linfa/mieloide)	-	+	-	+	6	GAS(IRF1=IFP>>Ly6)(IgH)
IL-7 (linfocitos)	-	+	-	+	5	GAS
IL-9 (linfocitos)	-	+	-	+	5	GAS
IL-13 (linfocito)	-	+	?	?	6	GAS
IL-15	?	+	?	+	5	GAS
Familia de gp140						
IL-3 (mieloide)	-	-	+	-	5	GAS(IRF1>IFP>>Ly6)
IL-5 (mieloide)	-	-	+	-	5	GAS
GM-CSF (mieloide)	-	-	+	-	5	GAS
Familia de la hormona del crecimiento						
GH	?	-	+	-	5	
PRL	?	+/-	+	-	1,3,5	
EPO	?	-	+	-	5	GAS (B-CAS>IRF1=IFP>>Ly6)
Tirosina Quinasas de Receptores						

Ligando de JAK	tyk2	STATS Jak1	Jak2	Jak3	GAS (elementos) o ISRE	
EGF	?	+	+	-	1,3	GAS (IRF1)
PDGF	?	+	+	-	1,3	
CSF-1	?	+	+	-	1,3	GAS (no IRF1)

Para construir un elemento promotor que contiene GAS sintético, que se utiliza en los Análisis Biológicos descritos en los Ejemplos 27-29, se emplea una estrategia basada en PCR para generar una secuencia promotora de GAS-SV40. El cebador 5' contiene cuatro copias en tándem del sitio de unión a GAS que encontrado en el promotor IRFL y que se ha demostrado previamente que se une a STAT tras la inducción con una variedad de citoquinas (Rothman et al., Immunity 1:457-468 (1994)), aunque se pueden utilizar otros elementos GAS o ISRE en su lugar. El cebador 5' también contiene 18 pb de la secuencia complementaria a la secuencia del promotor temprano de SV40 y está flanqueado con un sitio XhoI. La secuencia de cebador 5' es:

5': GCGCCTCGAGATTTCCTCCGAAATCTAGATTTCCTCCGAAATGATTTCCTCCGAAATGATTTCCTCCGAAATATCTG
CCATCTCAATTAG: 3' (SEQ ID NO: 54)

El cebador aguas abajo es complementario al promotor de SV40 y está flanqueado con un sitio Hind III: 5':
GCGGCAAGCTTTTTGCAAAGCCTAGGC: 3' (SEQ ID NO: 55)

La amplificación mediante PCR se realiza utilizando el molde del promotor de SV40 presente en el plásmido promotor gal B: obtenido de Clontech. El fragmento de PCR resultante se digiere con XhoI/Hind III y se subclona en BLSK2. La secuenciación con cebadores directo e inverso (Stratagene) confirma que el inserto contiene la siguiente secuencia:

5': CTCGAGATTTCCTCCGAAATCTAGATTTCCTCCGAAATGATTTCCTCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAGTCAGC
AACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTCCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTT
TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA
AAAGCTT: 3' (SEQ ID NO: 56)

Con este elemento promotor GAS conectado al promotor de SV40, se modifica genéticamente un constructo indicador GAS:SEAP2. Aquí, la molécula indicadora es una fosfatasa alcalina secretada, o "SEAP". Claramente, sin embargo, puede ser cualquier molécula indicadora en lugar de SEAP, en este o en cualquiera de los otros ejemplos. Las moléculas informadoras bien conocidas que se pueden utilizar en lugar de SEAP incluyen cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa, fosfatasa alcalina, B-galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), o cualquier proteína detectable por un anticuerpo.

La secuencia anterior confirmó que el elemento promotor GAS-SV40 sintético se subclona en el vector pSEAP-Promotor obtenido de Clontech utilizando HindIII y XhoI, reemplazando de manera efectiva el promotor de SV40 por el elemento promotor GAS:SV40 amplificado, para crear el vector GAS-SEAP. Sin embargo, este vector no contiene un gen de resistencia a neomicina, y por lo tanto, no se prefiere para sistemas de expresión de mamíferos.

Por lo tanto, con el fin de generar líneas celulares estables de mamífero que expresan el indicador GAS-SEAP, el casete de GAS-SEAP se retira del vector GAS-SEAP utilizando Sall y NotI, y se inserta en un vector de la cadena principal que contiene el gen de resistencia a neomicina, tal como pGFP-1 (Clontech), utilizando estos sitios de restricción en el sitio de clonación múltiple, para crear el vector GAS-SEAP/Neo. Una vez que este vector se transfecta a células de mamífero, este vector se puede usar a continuación como una molécula indicadora para la unión de GAS como se describe en los Ejemplos 27-29.

Se pueden preparar otros constructos utilizando la descripción anterior y sustituyendo GAS por una secuencia promotora diferente. Por ejemplo, la construcción de moléculas indicadoras que contienen secuencias promotoras de EGR y NF-KB se describen en los Ejemplos 27-31. Sin embargo, muchos otros promotores pueden ser sustituidos utilizando los protocolos descritos en estos Ejemplos. Por ejemplo, los promotores de SRE, IL-2, NFAT, o osteocalcina pueden ser sustituidos, solos o combinados (p. ej., GAS/NF-KB/EGR, GAS/NF-KB, IL-2/NFAT, o NF-KB/GAS). Del mismo modo, se pueden utilizar otras líneas celulares para someter a ensayo la actividad del constructo indicador, tales como HELA (epitelial), HUVEC (endotelial), Reh (célula B), Saos-2 (osteoblastos), HUVAC (aórtica), o Cardiomiocitos.

Ejemplo 25: Análisis de la actividad de SEAP

Como molécula indicadora para los análisis descritos en los ejemplos descritos en la presente memoria, la actividad SEAP se somete a ensayo utilizando el kit Tropix Phospho-ligth (Cat. BP-400) de acuerdo con el siguiente procedimiento general. El kit Tropix Phospho-ligth suministra la Dilución, el Análisis, y los Tampones de Reacción utilizados a continuación.

- 5 Cebear un dispensador con el tampón de dilución 2,5x y dispensar 15 µl de tampón de dilución 2,5x en OptiPlates que contienen 35 µl de una solución que contiene una proteína de fusión de albúmina de la invención. Sellar las placas con un sellador plástico e incubar a 65 grados Celsius durante 30 min. Separar las OptiPlates para evitar un calentamiento desigual.
- 10 Enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos. Vaciar el dispensador y cebear con el tampón de ensayo. Añadir 50 mL de Tampón de Ensayo e incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Vaciar el dispensador y cebear con el tampón de reacción (véase la tabla siguiente). Añadir 50 µl de tampón de reacción e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Dado que la intensidad de la señal quimioluminiscente es dependiente del tiempo, y se tarda aproximadamente 10 minutos en leer 5 placas en un luminómetro, se deben tratar 5 placas en cada momento y comenzar el segundo grupo 10 minutos más tarde.
- 15

Leer la unidad de luz relativa en el luminómetro. Establecer H12 como blanco, e imprimir los resultados. Un aumento de la quimioluminiscencia indica actividad indicadora.

Tabla 6

Núm. de placas	Diluyente tampón Rxn (ml)	CSPD (ml)	Núm. de placas	Diluyente tampón Rxn (ml)	CSPD (ml)
10	60	3	31	165	8,25
11	65	3,25	32	170	8,5
12	70	3,5	33	175	8,75
13	75	3,75	34	180	9
14	80	4	35	185	9,25
15	85	4,25	36	190	9,5
16	90	4,5	37	195	9,75
17	95	4,75	38	200	10
18	100	5	39	205	10,25
19	105	5,25	40	210	10,5
20	110	5,5	41	215	10,75
21	115	5,75	42	220	11
22	120	6	43	225	11,25
23	125	6,25	44	230	11,5
24	130	6,5	45	235	11,75
25	135	6,75	46	240	12

Núm, de placas	Diluyente tampón Rxn (ml)	CSPD (ml)	Núm. de placas	Diluyente tampón Rxn (ml)	CSPD (ml)
26	140	7	47	245	12,25
27	145	7,25	48	250	12,5
28	150	7,5	49	255	12,75
29	155	7,75	50	260	13
30	160	8			

Ejemplo 26: Ensayo de identificación de la actividad neuronal

5 Cuando las células experimentan diferenciación y proliferación, un grupo de genes se activan a través de diferentes rutas de transducción de señales. Uno de estos genes, EGR1 (gen de respuesta de crecimiento temprano 1), es inducido en diversos tejidos y tipos celulares tras la activación. El promotor de EGR1 es responsable de dicha inducción. Utilizando el promotor de EGR1 ligado a moléculas indicadoras, se puede evaluar la capacidad de las proteínas de fusión de la invención para activar las células.

10 En particular, se utiliza el siguiente protocolo para evaluar la actividad neuronal en líneas celulares PC12. Se sabe que las células PC12 (células de fenocromocitoma de rata) proliferan y/o se diferencian mediante activación con varios mitógenos, tales como TPA (acetato de tetradecanoilforbol), NGF (factor de crecimiento nervioso), y EGF (factor de crecimiento epidérmico). La expresión del gen EGR1 se activa durante este tratamiento. Por lo tanto, transfectando de manera estable células PC12 con un constructo que contiene un promotor de EGR conectado a un indicador SEAP, se puede evaluar la activación de las células PC12 por una proteína de fusión de albúmina de la presente invención.

15 El constructo indicador EGR/SEAP se puede ensamblar mediante el siguiente protocolo. La secuencia del promotor de EGR1 (-633 a +1) (Sakamoto K et al., Oncogene 6:867-871 (1991)) se puede amplificar mediante PCR a partir de ADN genómico humano utilizando los siguientes cebadores:

Primer cebador: 5' GCGCTCGAGGGATGACAGCGATAGAACCCCGG-3' (SEQ ID NO: 57)

Segundo cebador: 5' GCGAAGCTTCGCGACTCCCGGATCCGCCTC-3' (SEQ ID NO: 58)

20 Utilizando el vector GAS:SEAP/Neo producido en el Ejemplo 24, se puede insertar a continuación el producto amplificado de EGR1 en este vector. Linealizar el vector GAS:SEAP/Neo utilizando enzimas de restricción XhoI/HindIII, eliminando el relleno de GAS/SV40. Restringir el producto amplificado de EGR1 con estas mismas enzimas. Ligar el vector y el promotor EGR1.

25 Para preparar placas de 96 pocillos para el cultivo celular, se añaden dos mL de una solución de recubrimiento (dilución 1:30 de colágeno de tipo I (Upstate Biotech Inc. Núm de Cat. 08-115) en etanol del 30% (esterilizado mediante filtración)) por placa de 10 cm o 50 mL por pocillo de la placa de 96 pocillos, y se deja secar al aire durante 2 hr.

30 Las células PC12 se cultivan de forma rutinaria en medio RPMI-1640 (Bio Whittaker) que contiene suero de caballo al 10% (JRH Biosciences, Núm. de Cat. 12449-78P), suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 5% con un suplemento de 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina en una placa de cultivo de tejidos de 10 cm prerrevestida. Se realizan de una a cuatro divisiones cada tres o cuatro días. Las células se retiran de las placas mediante raspado y se resuspenden pipeteando arriba y abajo durante más de 15 veces.

35 Transfectar el constructo EGR/SEAP/Neo en PC12 utilizando mecanismos conocidos en la técnica. Se obtienen células estables EGR-SEAP/PC12 mediante el cultivo de las células en 300 µg/mL de G418. El medio libre de G418 se utiliza para el crecimiento de rutina, pero cada uno a dos meses, las células se deben volver a cultivar en 300 µg/mL de G418 para un par de pases.

40 Para someter a ensayo para la actividad neuronal, ase escruta una placa de 10 cm con células con aproximadamente 70 a 80% de confluencia eliminando el medio antiguo. Lavar las células una vez con PBS (Tampón Fosfato Salino). A continuación mantener en ayunas las células en medio bajo en suero (RPMI-1640 que contiene suero de caballo al 1% y FBS al 0,5% con antibióticos) durante la noche.

A la mañana siguiente, retirar el medio y lavar las células con PBS. Raspar las células de la placa, suspender las

células bien en 2 mL de medio con bajo contenido de suero. Contar el número de células y añadir más medio con bajo contenido de suero para alcanzar la densidad celular final de 5×10^5 células/mL.

Añadir 200 µl de la suspensión celular a cada pocillo de la placa de 96 pocillos (equivalente a 1×10^5 células/pocillo). Añadir una serie de diferentes concentraciones de una proteína de fusión de albúmina de la invención, 37 grados Celsius durante 48 a 72 h. Como control positivo, se puede utilizar un factor de crecimiento conocido para activar células las PC12 a través de EGR, tal como 50 ng/ul de Factor de Crecimiento Neuronal (NGF). Se observa típicamente más de cincuenta veces de inducción de SEAP en los pocillos de control positivo. El análisis SEAP se puede llevar a cabo de forma rutinaria utilizando mecanismos conocidos en la técnica y/o como se describe en el Ejemplo 25.

10 **Ejemplo 27: Ensayo para determinar la actividad de las células T**

Se utiliza el siguiente protocolo para evaluar la actividad de las células T identificando los factores, y determinando si una proteína de fusión de albúmina de la invención hace proliferar y/o diferenciar células-T. La actividad de las células T se evalúa utilizando el constructo GAS/SEAP/Neo producido en el Ejemplo 24. De este modo, los factores que aumentan la actividad de SEAP indican la capacidad para activar la ruta de transducción de la señal de Jaks-STATS. Las células T utilizadas en este análisis son células T de Jurkat (Núm. de Acceso de la ATCC TIB-152), aunque también se pueden utilizar células Molt-3 (Núm. de Acceso de la ATCC CRL-1552) y células Molt-4 (Núm. de Acceso de la ATCC CRL-1582).

Las células T de Jurkat son células colaboradoras Th1 CD4+ linfoblásticas. Con el fin de generar líneas celulares estables, se transfectan aproximadamente 2 millones de células Jurkat con el vector GAS-SEAP/neo utilizando DMRIE-C (Life Technologies) (procedimiento de transfección descrito a continuación). Las células transfectadas se siembran a una densidad de aproximadamente 20.000 células por pocillo y se seleccionan los transfectantes resistentes a 1 mg/mL de geneticina. Las colonias resistentes se expanden y a continuación se someten a ensayo para determinar su respuesta a concentraciones crecientes de interferón gamma. Se demuestra la respuesta a la dosis de un clon seleccionado.

Específicamente, el siguiente protocolo producirá células suficientes para 75 pocillos que contienen 200 µl de células. Por lo tanto, o bien se amplía, o bien se lleva a cabo múltiples veces para generar células suficientes para placas múltiples de 96 pocillos. Las células Jurkat se mantienen en RPMI + suero al 10% con Pen-Strep al 1%. Combinar 2,5 mL de OPTI-MEM (Life Technologies) con 10 µg de ADN plasmídico en un matraz T25. Añadir 2,5 mL de OPTI-MEM que contiene 50 µl de DMRIE-C e incubar a temperatura ambiente durante 15 a 45 minutos.

Durante el período de incubación, contar la concentración de células, centrifugar el número requerido de células (10^7 por transfección) y resuspender en OPTI-MEM a una concentración final de 10^7 células/mL. A continuación, añadir 1 mL de 1×10^7 células en OPTI-MEM al matraz T25 e incubar a 37 grados Celsius durante 6 horas. Después de la incubación, añadir 10 mL de RPMI + suero al 15%.

Las líneas indicadoras estables Jurkat:GAS-SEAP se mantienen en RPMI + suero al 10%, 1 mg/mL de geneticina, y Pen-Strep al 1%. Estas células se tratan con diversas concentraciones de una o más proteínas de fusión de la presente invención.

En el día del tratamiento con la proteína de fusión, las células se deben lavar y resuspender en RPMI + suero al 10% de nueva aportación a una densidad de 500.000 células por mL. El número exacto de células necesarias dependerá de la cantidad de proteínas de fusión y el número de diferentes concentraciones de proteínas de fusión que se vaya a escrutar. Para una placa de 96 pocillos, son necesarios aproximadamente 10 millones de células (para 10 placas, 100 millones de células).

Los pocillos que contienen células Jurkat tratadas con la proteína de fusión se colocan en una incubadora durante 48 horas (nota: este tiempo es variable entre 48-72 horas). Se transfieren a continuación muestras de 35 µl de cada pocillo a una placa opaca de 96 pocillos utilizando una pipeta de 12 canales. Las placas opacas se deben cubrir (utilizando cubiertas de Sellophene) y almacenar a -20 grados Celsius hasta que se realizan los análisis de SEAP de acuerdo con el Ejemplo 25. Las placas que contienen las células tratadas restantes se colocan a 4 grados Celsius y sirven como una fuente de material para repetir el análisis en un pocillo específico si se desea.

Como control positivo, se pueden utilizar 100 unidades/mL de interferón gamma que se sabe que activa las células T Jurkat. Se observa típicamente una inducción de más de 30 veces en los pocillos de control positivo.

El protocolo anterior se puede utilizar en la generación de células transfectadas de manera tanto transitoria como estables, lo que sería evidente para los expertos en la técnica.

Ejemplo 28: Ensayo para determinar la actividad de las células T

El NF-KB (Factor Nuclear KB) es un factor de transcripción activado por una amplia variedad de agentes, incluyendo las citoquinas inflamatorias IL-1 y TNF, CD30 y CD40, linfotóxina-alfa y linfotóxina-beta, mediante exposición a LPS o trombina, y mediante la expresión de ciertos productos génicos virales. Como factor de transcripción, el NF-KB

regula la expresión de genes implicados en la activación de células inmunitarias, el control de la apoptosis (NF-KB parece proteger a las células de la apoptosis), el desarrollo de células B y T, las respuestas antivirales y antimicrobianas, y múltiples las respuestas al estrés.

5 En condiciones no estimuladas, NF-KB es retenido en el citoplasma con I-KB (Inhibidor KB). Sin embargo, tras la estimulación, I-KB se fosforila y se degrada, haciendo que NF-KB se traslade al núcleo, activando de este modo la transcripción de los genes diana. Los genes diana activados por NF-KB incluyen IL-2, IL-6, GM-CSF, ICAM-1 y MHC de clase 1.

10 Debido a su papel central y a la capacidad de responder a una serie de estímulos, los constructos indicadores que utilizan el elemento promotor de NF-KB se utilizan para detectar la proteína de fusión. Los activadores o inhibidores de NF-KB serían útiles en el tratamiento, la prevención, y/o el diagnóstico de enfermedades. Por ejemplo, los inhibidores de NF-KB se podrían utilizar para el tratamiento de aquellas enfermedades relacionadas con la activación aguda o crónica de NF-KB, tales como la artritis reumatoide.

15 Para construir un vector que contiene el elemento promotor de NF-KB, se emplea una estrategia basada en PCR. El cebador aguas arriba contiene cuatro copias en tándem del sitio de unión de NF-KB (GGGGACTTTCCC) (SEQ ID NO: 59), 18 pb de la secuencia complementaria al extremo 5' de la secuencia del promotor temprano de SV40, y está flanqueado con un sitio XhoI:

5': GCGGCCTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGACTTTCCATCCTGCCATCTCAAT
TAG: 3' (SEQ ID NO: 60)

20 El cebador aguas abajo es complementario al extremo 3' del promotor de SV40 y está flanqueado por un sitio *Hind* III:

5': GCGGCAAGCTTTTTGCAAAGCCTAGGC: 3' (SEQ ID NO: 55)

25 La amplificación mediante PCR se realiza utilizando el molde del promotor de SV40 presente en el plásmido PB-gal:promotor obtenido de Clontech. El fragmento de PCR resultante se digiere con XhoI y Hind III y se subclona en BLSK2- (Stratagene). La secuenciación con los cebadores de T7 y T3 confirma que el inserto contiene la siguiente secuencia:

5':CTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGACTTTCCATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGC
CCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAG
GCCGAGGCCGCTCGGCTCTGAGCTATTCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTGGAGGCCTAGGCTTTGCAAAAAGCTT:3' (SEQ
ID NO:61)

A continuación, reemplazar el elemento promotor mínimo de SV40 presente en el plásmido pSEAP2-promotor (Clontech) por este fragmento NF-KB/SV40 utilizando XhoI y HindIII. Sin embargo, este vector no contiene un gen de resistencia a neomicina, y por lo tanto, no se prefiere para sistemas de expresión de mamíferos.

30 Con el fin de generar líneas celulares de mamífero estables, el casete NF-KB/SV40/SEAP se retira del vector NF-KB/SEAP anterior utilizando las enzimas de restricción Sall y NotI, y se inserta en un vector que contiene resistencia a neomicina. En particular, el casete NF-KB/SV40/SEAP se inserta en pGFP-1 (Clontech), reemplazando el gen GFP, después de someter pGFP-1 a las enzimas de restricción Sall y NotI.

35 Una vez que se crea el vector NF-KB/SV40/SEAP/Neo, las células T Jurkat estables se crean y se mantienen de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 25. Del mismo modo, el método para analizar las proteínas de fusión con estas células T Jurkat estables también se describe en el Ejemplo 25. Como control positivo, se añade TNF alfa exógeno (0,1, 1, 10 ng) a los pocillos H9, H10, y H11, observándose típicamente una activación de 5-10 veces.

Ejemplo 29: Ensayo de identificación de la actividad mieloide

40 El siguiente protocolo se utiliza para evaluar la actividad mieloide de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención mediante la determinación de si la proteína de fusión hace proliferar y/o diferenciar células mieloides. La actividad de las células mieloides se evalúa utilizando el constructo GAS/SEAP/Neo producido en el Ejemplo 24. De este modo, los factores que aumentan la actividad de SEAP indican la capacidad para activar la ruta de transducción de señales Jaks-STATS. La célula mieloide utilizada en este análisis es U937, una línea celular premonocítica, aunque se pueden utilizar TF-1, HL60, o KG1.

45 Para transfectar de forma transitoria células U937 con el constructo GAS/SEAP/Neo producido en el Ejemplo 24, se utiliza un método de DEAE-dextrano (Kharbanda et. al., 1994, Cell Growth & Differentiation, 5:259-265). En primer lugar, cosechar 2×10^7 células U937 y lavar con PBS. Las células U937 se cultivan generalmente en RPMI 1640 que contiene suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10%, con un suplemento de 100 unidades/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina.

50 A continuación, suspender las células en 1 mL de Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) que contiene 0,5 mg/mL de DEAE-

dextrano, 8 µg de ADN del plásmido GAS-SEAP2, NaCl 140 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 375 uM, MgCl₂ 1 mM, y CaCl₂ 675 uM. Incubar a 37 grados Celsius durante 45 min.

Lavar las células con medio RPMI 1640 que contiene FBS al 10% y a continuación volver a suspender en 10 mL de medio completo e incubar a 37 grados Celsius durante 36 hr.

- 5 Las células GAS-SEAP/U937 estables se obtienen mediante el cultivo de las células en 400 µg/mL de G418. El medio sin G418 se utiliza para el crecimiento de rutina, pero cada uno a dos meses, las células se deben volver a cultivar en 400 µg/mL de G418 para un par de pases.

- 10 Estas células son sometidas a ensayo cosechando 1×10^8 células (esto es suficiente para un análisis con diez placas de 96 pocillos) y se lavan con PBS. Suspender las células en 200 mL del medio de crecimiento descrito anteriormente, con una densidad final de 5×10^5 células/mL. Cultivar en placa 200 µl de células por pocillo en la placa de 96 pocillos (o 1×10^5 células/pocillo).

- 15 Añadir diferentes concentraciones de la proteína de fusión. Incubar a 37 grados Celsius durante 48 a 72 h. Como control positivo, se pueden utilizar 100 unidades/mL de interferón gamma que se sabe que activa las células U937. Se observa típicamente una inducción de más de 30 veces en los pocillos de control positivo. Analizar SEAP del sobrenadante de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y/o el protocolo descrito en el Ejemplo 25.

Ejemplo 30: Análisis que identifica cambios en la concentración y la permeabilidad de la membrana de moléculas pequeñas

- 20 Se sabe que la unión de un ligando a un receptor altera los niveles intracelulares de moléculas pequeñas, tales como calcio, potasio, sodio, y el pH, así como altera el potencial de membrana. Estas alteraciones pueden medirse en un análisis para identificar proteínas de fusión que se unen a receptores de una célula concreta. Aunque el siguiente protocolo describe un análisis para el calcio, este protocolo puede modificarse fácilmente para detectar cambios en el potasio, el sodio, el pH, el potencial de membrana, o cualquier otra molécula pequeña que sea detectable mediante una sonda fluorescente.

- 25 El siguiente análisis utiliza Fluorometric Imaging Plate Reader ("FLIPR") para medir cambios en moléculas fluorescentes (Molecular Probes) que se unen moléculas pequeñas. Claramente, se puede utilizar cualquier molécula fluorescente que detecte una molécula pequeña en lugar de la molécula fluorescente de calcio, fluo-4 (Molecular Probes, Inc.; Núm. de catálogo. F-14202), que se utiliza aquí.

- 30 Para células adherentes, sembrar las células a 10.000-20.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de color negro Costar con fondo transparente. La placa se incuba en una incubadora con CO₂ durante 20 horas. Las células adherentes se lavan dos veces en una lavadora Biotek con 200 µl de HBSS (solución salina equilibrada de Hank) dejando 100 µl de tampón después del lavado final.

- 35 Se prepara una solución de partida de 1 mg/mL de fluo-4 en DMSO con ácido plurónico al 10%. Para cargar las células con fluo-4, se añaden 50 µl de fluo-4 de 12 µg/mL a cada pocillo. La placa se incuba a 37 grados Celsius en una incubadora con CO₂ durante 60 minutos. La placa se lava cuatro veces en la lavadora Biotek con HBSS dejando 100 µl de tampón.

- 40 Para las células no adherentes, las células se centrifugan de los medios de cultivo. Las células se vuelven a suspender a 2×10^6 células/mL con HBSS en un tubo cónico de 50 mL. Se añaden 4 µl de solución de fluo-4 de 1 mg/mL en DMSO con ácido plurónico al 10% de a cada mL de suspensión celular. El tubo se coloca a continuación en un baño de agua a 37 grados Celsius durante 30 a 60 min. Las células se lavan dos veces con HBSS, se vuelven a suspender a 1×10^6 células/mL, y se dispensan a una microplaca, 100 µl/pocillo. La placa se centrifuga a 1000 rpm durante 5 min. La placa se lava una vez en Denley Cell Wash con 200 µl, seguido de una etapa de aspiración hasta un volumen final 100 µl.

Para un análisis no basado en células, cada pocillo contiene una molécula fluorescente, tal como fluo-4. La proteína de fusión de la invención se añade al pocillo, y se detecta un cambio en la fluorescencia.

- 45 Para medir la fluorescencia del calcio intracelular, el FLIPR se ajusta los siguientes parámetros: (1) La ganancia del sistema es de 300-800 mW; (2) El tiempo de exposición es de 0,4 segundos; (3) La Cámara F/parada es F/2; (4) La excitación es de 488 nm; (5) La emisión es de 530 nm; y (6) La adición de la muestra es 50 µl. El aumento de emisión a 530 nm indica un acontecimiento de señalización extracelular causada por una proteína de fusión de albúmina de la presente invención o una molécula inducida por una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, que da como resultado un aumento de la concentración de Ca⁺⁺ intracelular.

Ejemplo 31: Ensayo de identificación de la actividad tirosina quinasa

Las proteínas tirosina quinasas (PTK) representan un grupo diverso de quinasas transmembrana y citoplasmáticas. Dentro del grupo de la Proteína Tirosina Quinasa del Receptor (RPTK) son receptores para una serie de factores de crecimiento mitogénicos y metabólicos, incluyendo PDGF, FGF, EGF, NGF, HGF y subfamilias del receptor de

insulina. Además, hay una gran familia de RPTK para la que el correspondiente ligando es desconocido. Los ligandos para RPTK incluyen pequeñas proteínas secretadas principalmente, pero también proteínas unidas a la membrana y de la matriz extracelular.

La activación de RPTK por ligandos implica la dimerización del receptor mediada por ligando, que da como resultado la transfosforilación de las subunidades del receptor y la activación de las tirosina quinasas citoplásmicas. Las tirosina quinasas citoplásmicas incluyen tirosina quinasas asociadas a receptores de la familia Src (p. ej., src, yes, lck, lyn, fyn) y proteínas tirosina quinasas no unidas a receptor y citosólicas, tales como la familia Jak, miembros de la cual median en la transducción de señales provocada por la superfamilia de receptores de citoquinas (p. ej., las interleucinas, interferones, GM-CSF, y Leptina).

Debido a la amplia gama de factores conocidos capaces de estimular la actividad tirosina quinasa, es de interés la identificación de si una proteína de fusión de albúmina de la presente invención o una molécula inducida por una proteína de fusión de la presente invención es capaz de activar las rutas de transducción de señales de tirosina quinasa. Por lo tanto, el siguiente protocolo está diseñado para identificar tales moléculas capaces de activar las rutas de transducción de señales de tirosina quinasa.

Sembrar células diana (p. ej., queratinocitos primarios) a una densidad de aproximadamente 25.000 células por pocillo en placas Loprodyne Silent Screen de 96 pocillos adquiridas a Nalge Nunc (Naperville, IL). Las placas se esterilizan con dos enjuagues de 30 minutos con etanol del 100%, se aclaran con agua y se secan durante la noche. Algunas placas se recubren durante 2 h con 100 mL de colágeno de tipo I de grado de cultivo celular (50 mg/ml), gelatina (2%) o polilisina (50 mg/ml), todos los cuales pueden ser adquiridos de Sigma Chemicals (St. Louis, MO) o Matrigel al 10% adquirido a Becton Dickinson (Bedford, MA), o suero de ternera, se enjuagan con PBS y se almacenan a 4 grados Celsius. Se somete a ensayo el crecimiento celular en estas placas sembrando 5.000 células/pocillo en medio de crecimiento y cuantificando indirectamente el número de células a través del uso de azul Alamar como describe el fabricante Alamar Biosciences, Inc. (Sacramento, CA) después de 48 hr. Se utilizan cubres de placas Falcon Núm. 3071 de Becton Dickinson (Bedford, MA) para cubrir las placas Loprodyne Silent Screen. También se pueden utilizar placas de cultivo celular Falcon Microtest III en algunos experimentos de proliferación.

Para preparar los extractos, las células A431 se siembran en las membranas de nailon de placas Loprodyne (20.000/200 ml/pocillo) y se cultivan durante la noche en medio completo. Las células se llevan a quiescencia mediante incubación en medio basal libre de suero durante 24 hr. Después del tratamiento de 5-20 minutos con EGF (60 ng/ml) o a diferentes concentraciones de una proteína de fusión de albúmina de la invención, se retira el medio y se añaden a cada pocillo 100 mL de tampón de extracción ((HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,1%, Na₃VO₄ 2 mM, Na₄P₂O₇ 2 mM y un cóctel de inhibidores de proteasa (Núm. 1836170) obtenido de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN)) y la placa se agita en un aparato de sacudimiento giratorio durante 5 minutos a 4°C. La placa se coloca a continuación en un colector de transferencia de vacío y el extracto se filtra a través de los fondos de membrana de 0,45 mm de cada pocillo utilizando vacío doméstico. Los extractos se recogen en una placa de captura/análisis de 96 pocillos en la parte inferior del colector de vacío y se colocan inmediatamente en hielo. Para obtener extractos aclarados mediante centrifugación, se retira el contenido de cada pocillo, después de la solubilización con detergente durante 5 minutos, y se centrifuga durante 15 minutos a 4 grados Celsius a 16.000 x g.

Someter a ensayo los extractos filtrados para determinar los niveles de actividad de la tirosina quinasa. Aunque se conocen muchos métodos de detección de la actividad de la tirosina quinasa, se describe aquí un método.

En general, la actividad de la quinasa de tirosina de una proteína de fusión de albúmina de la invención se evalúa mediante la determinación de su capacidad para fosforilar un residuo de tirosina en un sustrato específico (un péptido biotinilado). Los péptidos biotinilados que se pueden utilizar para este propósito incluyen PSKI (correspondiente a los aminoácidos 6-20 de la quinasa de división celular cdc2-p34) y PSK2 (correspondiente a los aminoácidos 1-17 de la gastrina). Ambos péptidos son sustratos para una variedad de tirosina quinasas y están disponibles de Boehringer Mannheim.

La reacción de tirosina quinasa se establece mediante la adición de los siguientes componentes en orden. En primer lugar, añadir 10 µl de Péptido Biotinilado 5 uM, a continuación, 10 µl de ATP/Mg²⁺ (ATP 5 mM/ MgCl₂ 50 mM), a continuación 10 µl de 5x Tampón de Análisis (hidrocloruro de imidazol 40 mM, pH 7,3, beta-glicerofosfato 40 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 100 mM, MnCl₂ 5 mM, BSA de 0,5 mg/mL), a continuación 5 µl de Vanadato de Sodio (1 mM), y después 5 µl de agua. Mezclar los componentes suavemente y preincubar la mezcla de reacción a 30 grados Celsius durante 2 min. Iniciar la reacción mediante la adición de 10 µl de la enzima de control o del sobrenadante filtrado.

La reacción de análisis de la tirosina quinasa se termina a continuación añadiendo 10 µl de EDTA 120 mM y colocando las reacciones en hielo.

La actividad tirosina quinasa se determina transfiriendo alícuotas de 50 µl de la mezcla de reacción a un módulo de placa de microtitulación (MTP) e incubando a 37 grados Celsius durante 20 min. Esto permite que la placa de 96 pocillos recubierta de estreptavidina se asocie con el péptido biotinilado. Lavar el módulo de MTP con 300 µl/pocillo

de PBS cuatro veces. A continuación añadir 75 µl de anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-P-Tyr-POD (0,5 U/ml)) a cada pocillo y e incubar a 37 grados Celsius durante una hora. Lavar el pocillo como antes.

- 5 A continuación añadir 100 µl de solución de sustrato de peroxidasa (Boehringer Mannheim) e incubar a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos (hasta 30 minutos). Medir la absorbancia de la muestra a 405 nm mediante el uso de lector de ELISA. El nivel de actividad peroxidasa unida se cuantifica utilizando un lector de ELISA y refleja el nivel de actividad tirosina quinasa.

Ejemplo 32: Análisis de identificación de la actividad de fosforilación

- 10 Como una alternativa potencial y/o complemento del análisis de la actividad de proteína tirosina quinasa descrito en el Ejemplo 31, también se puede utilizar un análisis que detecta la activación (fosforilación) de los principales intermedios de transducción de señales intracelulares. Por ejemplo, como se describe a continuación un análisis concreto puede detectar la fosforilación de la tirosina de las quinasas Erk-1 y Erk-2. Sin embargo, la fosforilación de otras moléculas, tales como Raf, JNK, p38 MAP, Map quinasa quinasas (MEK), MEK quinasa, Src, quinasa específica de Músculo (MuSK), IRAK, Tec y Janus, así como cualquier otra molécula de fosfoserina, fosfotirosina o fosfotreonina, se puede detectar mediante la sustitución de estas moléculas por Erk- 1 o ERK-2 en el siguiente análisis.

- 20 En concreto, se preparan placas de análisis mediante el recubrimiento de los pocillos de una placa de 96 pocillos de ELISA con 0,1 mL de proteína G (1 µg/ml) durante 2 horas a temperatura ambiente, (RT). Las placas se aclaran con PBS y se bloquean con BSA al 3%/PBS durante 1 hora a RT. Las placas de la proteína G se tratan a continuación con 2 anticuerpos monoclonales comerciales (10 ng/pocillo) contra Erk-1 y Erk-2 (1 hora a RT) (Santa Cruz Biotechnology). (Para detectar otras moléculas, esta etapa se puede modificar fácilmente mediante la sustitución de un anticuerpo monoclonal que detecta cualquiera de las moléculas anteriormente descritas). Después de 3 a 5 lavados con PBS, las placas se almacenan a 4 grados Celsius hasta su uso.

- 25 Las células A431 se siembran a 20.000/pocillo en una placa filtrante de 96 pocillos Loprodyne y se cultivan durante la noche en medio de crecimiento. Las células se mantienen a continuación en ayunas durante 48 horas en medio basal (DMEM) y después se tratan con EGF (6 ng/pocillo) o concentraciones variables de la proteína de fusión de la invención durante 5-20 minutos. Las células se solubilizan y se filtran los extractos directamente a la placa de análisis.

- 30 Después de la incubación con el extracto durante 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se aclaran de nuevo. Como control positivo, se utiliza una preparación comercial de quinasa MAP (Long/pocillo) en lugar de extracto de A431. Las placas se tratan a continuación con un anticuerpo policlonal comercial (de conejo) (1 µg/ml) que reconoce específicamente el epítipo fosforilado de las quinasas Erk-1 y Erk-2 (1 hora a RT). Este anticuerpo se biotinila mediante procedimientos convencionales. El anticuerpo policlonal unido se cuantifica a continuación mediante incubaciones sucesivas con reactivo potenciador de la fluorescencia de Europio-estreptavidina y Europio en el aparato Wallac DELFIA (fluorescencia resuelta en el tiempo). Una aumento de la señal fluorescente sobre el fondo indica una fosforilación por la proteína de fusión de la presente invención o una molécula inducida por una proteína de fusión de albúmina de la presente invención.

Ejemplo 33: Análisis de fosforilación

- 40 Con el fin de analizar la actividad de fosforilación de una proteína de fusión de albúmina de la invención, se utiliza un análisis de fosforilación como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.958.405 (que se incorpora a la presente memoria como referencia). En pocas palabras, la actividad de fosforilación puede medirse mediante fosforilación de un sustrato de proteína utilizando ³²P-ATP marcado en gamma y cuantificación de la radiactividad incorporada utilizando un contador gamma de radioisótopos. La proteína de fusión de la invención se incuba con el sustrato de proteína, ³²P-ATP, y un tampón de quinasa. El ³²P incorporado al sustrato se separa a continuación del ³²P-ATP libre mediante electroforesis y el ³²P incorporado se cuenta y se compara con un control negativo. Los recuentos de radiactividad por encima del control negativo son indicativos de actividad de fosforilación de la proteína de fusión.

Ejemplo 34: Detección de la actividad de fosforilación (activación) de una proteína de fusión de albúmina de la invención en presencia de ligandos polipeptídicos

- 50 Los métodos conocidos en la técnica o descritos en la presente memoria se pueden utilizar para determinar la actividad de fosforilación de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Un método preferido para determinar la actividad de fosforilación es por medio del uso del análisis de fosforilación de tirosina como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. US 5.817.471 (que se incorpora a la presente memoria como referencia).

Ejemplo 35: Análisis para determinar la estimulación de la proliferación de células CD34+ de médula ósea

- 55 Este análisis se basa en la capacidad de CD34+ humanas para proliferar en presencia de factores de crecimiento hematopoyéticos y evalúa la capacidad de las proteínas de fusión de la invención para estimular la proliferación de

células CD34+.

Se ha demostrado previamente que los precursores más maduros responderán a solamente a una única señal. Los precursores más inmaduros requieren al menos dos señales para responder. Por lo tanto, para someter a ensayo el efecto de las proteínas de fusión de la invención sobre la actividad hematopoyética de una amplia variedad de células progenitoras, el análisis contiene una proteína de fusión dada de la invención en presencia o ausencia de factores de crecimiento hematopoyéticos. Las células aisladas se cultivan durante 5 días en presencia de Factor de Células Madre (SCF) combinado con la muestra analizada. El SCF solo tiene un efecto muy limitado sobre la proliferación de células de médula ósea (BM), actuando en tales condiciones sólo como un factor de "supervivencia". Sin embargo, combinado con cualquier factor que exhiba efecto estimulador en estas células (p. ej., IL-3), el SCF causará un efecto sinérgico. Por lo tanto, si la proteína de fusión sometida a ensayo tiene un efecto estimulador sobre los progenitores hematopoyéticos, tal actividad puede ser detectada fácilmente. Puesto que las células de BM normales tienen un bajo nivel de células en ciclo, es probable que cualquier efecto inhibidor de una proteína de fusión dada pudiera no ser detectado. En consecuencia, los análisis para determinar un efecto inhibidor sobre progenitores se someten a ensayo preferiblemente en células que se someten primero a la estimulación *in vitro* con SCF+IL-3, y después se ponen en contacto con el compuesto que se está evaluando para la inhibición de tal proliferación inducida.

En resumen, las células CD34+ se aíslan utilizando métodos conocidos en la técnica. Las células se descongelan y se resuspenden en medio (medio libre de suero QBSF 60 con L-glutamina al 1% (500 ml) Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD Núm. Cat. 160-204-101). Después de varias etapas de centrifugación suave a 200 xg, se dejan las células en reposo durante una hora. El recuento de células se ajusta a $2,5 \times 10^5$ células/mL. Durante este tiempo, se añaden 100 µl de agua estéril a los pocillos periféricos de una placa de 96 pocillos. La citoquina que se puede someter a ensayo con una proteína de fusión de albúmina de la invención en este análisis es rhSCF (R & D Systems, Minneapolis, MN, Núm. Cat. 255-SC) a 50 ng/mL sola y combinada con rhSCF y rhIL-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, Núm. Cat. 203-ML) a 30 ng/mL. Después de una hora, se añaden 10 µl de las citoquinas preparadas, concentraciones variables de una proteína de fusión de albúmina de la invención, y 20 µl de células diluidas al medio que ya está presente en los pocillos para permitir un volumen total final de 100 µl. Las placas se colocan a continuación en una a 37°C/CO₂ al 5% durante cinco días.

Dieciocho horas antes de cosechar el ensayo, se añaden 0,5 µCi/pocillo de [3H]Timidina en un volumen de 10 µl a cada pocillo para determinar la tasa de proliferación. El experimento se termina mediante la recolección de las células de cada placa de 96 pocillos en un Filtermat utilizando el Tomtec Harvester 96. Después de la cosecha, los Filtermat se secan, se cortan y se colocan en conjuntos OmniFilter que consisten en una placa OmniFilter y una bandeja OmniFilter. Se añaden 60 µl de Microscint a cada pocillo y la placa se sella con película de sellado a presión TopSeal-A. Se fija a la primera placa una etiqueta 15 de código de barras para el recuento. Las placas selladas se cargan y se determina el nivel de radiactividad mediante el Packard Top Count y los datos impresos se recogen para su análisis. El nivel de radioactividad refleja la cantidad de proliferación celular.

Los estudios descritos en este ejemplo de ensayo de la actividad de una proteína de fusión dada para estimular la médula ósea la proliferación de células CD34+. Un experto en la técnica podría modificar fácilmente los estudios ilustrativos para analizar la actividad de proteínas y polinucleótidos de fusión de la invención (p. ej., terapia génica), así como agonistas y antagonistas de los mismos. La capacidad de una proteína de fusión de albúmina de la invención para estimular la proliferación de células CD34+ de la médula ósea indica que la proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina que corresponden a la proteína de fusión son útiles para el diagnóstico y tratamiento de trastornos que afectan el sistema inmunitario y la hematopoyesis. Los usos representativos se describen en las secciones de "Actividad Inmunitaria" y "Enfermedad infecciosa" anteriores, y en otras partes de la presente memoria.

Ejemplo 36: Análisis de la respuesta celular mejorada por la matriz extracelular (RCMME)

El objetivo del análisis de respuesta celular mejorada por la matriz extracelular (RCMME) es evaluar la capacidad de las proteínas de fusión de la invención para actuar sobre las células madre hematopoyéticas en el contexto de la señal inducida por la matriz extracelular (MEC).

Las células responden a los factores reguladores en el contexto de la señal o señales recibidas desde el microentorno circundante. Por ejemplo, los fibroblastos y las células madre endoteliales y epiteliales dejan de replicarse en ausencia de señales de la MEC. Las células madre hematopoyéticas pueden experimentar auto-renovación en la médula ósea, pero no en cultivo en suspensión *in vitro*. La capacidad de las células madre para experimentar auto-renovación *in vitro* depende de su interacción con las células del estroma y la proteína fibronectina de la MEC (fn). La adhesión de las células a la fn está mediada por los receptores de integrina $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_4\beta_1$, que se expresan por las células madre hematopoyéticas humanas y de ratón. El factor o los factores que se integran con el entorno de la MEC y son responsables de la estimulación de la autorrenovación de las células madre aún no han sido identificados. El descubrimiento de estos factores debe ser de gran interés en aplicaciones de terapia génica y trasplante de médula ósea.

En resumen, placas de 96 pocillos de poliestireno, sin tratamiento para cultivo de tejido, se recubren con el

fragmento fn a una concentración de recubrimiento de 0,2 µg/cm². Se cultivan en placa células de médula ósea de ratón (1.000 células/pocillo) en 0,2 mL de medio libre de suero. Las células cultivadas en presencia de IL-3 (5 ng/ml) + SCF (50 ng/ml) servirían como el control positivo, condiciones en las que se podrían esperar poca auto-renovación pero pronunciada diferenciación de las células madre. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se someten a ensayo con controles negativos apropiados en presencia y ausencia de SCF (5,0 ng/ml), donde el volumen de la composición administrada que contiene la proteína de fusión de albúmina de la invención representa 10% del volumen total de ensayo. Las células cultivadas en placa se dejan crecer a continuación mediante incubación en un entorno con poco oxígeno (5% de CO₂, 7% O₂, y 88% N₂) en una incubadora para cultivo de tejidos durante 7 días. El número de células en proliferación dentro de los pocillos se cuantifica a continuación midiendo la incorporación de timidina al ADN celular. La verificación de los éxitos positivos en el análisis requerirá la caracterización fenotípica de las células, lo que se puede lograr aumentando a escala el sistema de cultivo y utilizando reactivos de anticuerpos apropiados contra los antígenos de la superficie celular y FACScan.

Si se encuentra que una proteína de fusión concreta de la presente invención es un estimulador de los progenitores hematopoyéticos, la proteína de fusión y los polinucleótidos correspondientes a la proteína de fusión pueden ser útiles por ejemplo, en el diagnóstico y tratamiento de trastornos que afectan al sistema inmunitario y la hematopoyesis. Los usos representativos se describen en las secciones de "Actividad Inmunitaria" y "Enfermedad Infecciosa" anteriores, y en otras partes en la presente memoria. La proteína de fusión también puede ser útil en la expansión de células madre y progenitores comprometidos de diversas estirpes sanguíneas y en la diferenciación y/o proliferación de diversos tipos de células.

Además, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, también se pueden emplear para inhibir la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y por lo tanto se pueden emplear para proteger las células madre de la médula ósea de los agentes quimioterapéuticos durante la quimioterapia. Este efecto antiproliferativo puede permitir la administración de dosis mayores de agentes quimioterapéuticos y, por lo tanto, tratamiento quimioterapéutico más eficaz.

Por otra parte, las proteínas de fusión de la invención y los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden ser útiles para el tratamiento y diagnóstico de trastornos hematopoyéticos relacionados tales como, anemia, pancitopenia, leucopenia, trombocitopenia o leucemia, ya que las células estromales son importantes en la producción de células de linajes hematopoyéticos. Los usos incluyen el cultivo de células de médula ósea ex vivo, el trasplante de médula ósea, la reconstitución de médula ósea, la radioterapia o la quimioterapia de la neoplasia.

Ejemplo 37: Proliferación de fibroblastos dérmicos y células de músculo liso aórtico humanos

Se añade una proteína de fusión de albúmina de la invención a cultivos de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) y células de músculo liso aórtico humanas (AoSMC) y se realizan dos análisis simultáneos con cada muestra. El primer análisis examina el efecto de la proteína de fusión sobre la proliferación de los fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) o las células del músculo liso aórtico (AoSMC). El crecimiento aberrante de fibroblastos o células del músculo liso es una parte de varios procesos patológicos, incluyendo la fibrosis, y la restenosis. El segundo análisis examina la producción de IL6 por NHDF y SMC. La producción de IL6 es una indicación de activación funcional. Las células activadas habrán aumentado la producción de diversas citoquinas y otros factores, lo que puede dar lugar a un resultado proinflamatorio o inmunomodulador. Los análisis se realizan con y sin co-estimulación con TNFα, con el fin de comprobar la actividad co-estimuladora o inhibidora.

En resumen, el día 1, placas de 96 pocillos de color negro se disponen con 1000 células/pocillo (NHDF) o 2000 células/pocillo (AoSMC) en medios de cultivo de 100 µl. El medio de cultivo NHDF contiene: medio basal FB Clonetics, 1 mg/mL de hFGF, 5 mg/mL de insulina, 50 mg/mL de gentamicina, FBS al 2%, mientras que los medios de cultivo AoSMC contiene medio basal SM Clonetics, 0,5 µg/mL de hEGF, 5 mg/mL de insulina, 1 µg/mL de hFGF, 50 mg/mL de gentamicina, 50 µg/mL de Anfotericina B, FBS al 5%. Después de la incubación a 37°C durante al menos 4-5 horas los medios de cultivo se aspiran y se reemplazan por medio de detención del crecimiento. Los medios de detención del crecimiento para NHDF contienen medio basal de fibroblastos, 50 mg/mL de gentamicina, FBS al 2%, mientras que los medios para la detención del crecimiento para AoSMC contienen medio basal SM, 50 mg/mL de gentamicina, 50 µg/mL de Anfotericina B, FBS al 0,4%. Se incuba a 37°C hasta el día 2.

El día 2, se diseñan diluciones seriadas y moldes de una proteína de fusión de albúmina de la invención de manera que siempre incluyan controles de medios y controles de proteína conocida. Para ambos experimentos de estimulación e inhibición, las proteínas se diluyen en medios de detención del crecimiento. Para los experimentos de inhibición, se añade TNFα a una concentración final de 2 ng/mL (NHDF) o 5 ng/mL (AoSMC). Añadir controles que contienen 1/3 de vol de medio o una proteína de fusión de albúmina de la invención e incubar a 37 grados Celsius/5% de CO₂ hasta el día 5.

Transferir 60 µl de cada pocillo a otra placa de 96 pocillos marcada, cubierta con un sellador de placas, y almacenar a 4°C hasta el Día 6 (para ELISA de IL-6). A los 100 µl restantes de la placa de cultivo celular, añadir asépticamente Azul Alamar en una cantidad igual al 10% del volumen de cultivo (10 µl). Devolver placas a la incubadora durante 3 a 4 horas. A continuación, medir la fluorescencia con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm utilizando CytoFluor.

Esto produce los datos de estimulación/inhibición del crecimiento.

El día 5, se lleva a cabo el ELISA para IL6 recubriendo una placa de 96 pocillos con 50 a 100 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal anti-IL6 humana diluido en PBS, pH 7,4, incubar ON a temperatura ambiente.

- 5 El día 6, vaciar los platos en el fregadero y secar con papel absorbente. Preparar Tampón de Ensayo que contiene PBS con BSA al 4%. Bloquear las placas con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo Pierce Super Block en PBS durante 1-2 horas y a continuación lavar las placas con tampón de lavado (PBS, Tween-20 al 0,05%). Secar la placas sobre papel absorbente. A continuación, añadir 50 µl/pocillo de anticuerpo marcado con Biotina monoclonal Anti-IL-6 humana diluido, en 0,50 mg/mL. Preparar diluciones de partida de IL-6 en los medios (30, 10, 3, 1, 0,3, 0 ng/ml). Añadir muestras por duplicado a la fila superior de la placa. Cubrir las placas e incubar durante 2 horas a RT en un agitador.

Las placas se lavan con tampón de lavado y se transfieren a papel absorbente. Diluir la estreptavidina marcada con EU 1:1000 en Tampón de análisis, y añadir 100 µl/pocillo. Cubrir la placa e incubar 1 hora a RT. Las placas se lavan de nuevo con tampón de lavado y se transfieren a papel absorbente.

- 15 Añadir 100 µl/pocillo de Solución de Mejora. Agitar durante 5 minutos. Leer la placa en el Fluorómetro DELFIA Wallac. Las lecturas de las muestras por triplicado en cada análisis se tabulan y se promedian.

- 20 Un resultado positivo en este análisis sugiere la proliferación de células AoSMC y que la proteína de fusión de albúmina puede estar implicada en la proliferación de fibroblastos dérmicos y/o la proliferación de células del músculo liso. Un resultado positivo también sugiere muchos usos potenciales de la proteína y polinucleótidos de fusión que codifican la proteína de fusión de albúmina. Por ejemplo, la inflamación y la respuesta inmunitaria, la curación de heridas y la angiogénesis, como se detalla a lo largo de esta memoria descriptiva. En particular, las proteínas de fusión se pueden utilizar en la cicatrización de heridas y la regeneración dérmica, así como la promoción de la vasculogénesis, tanto de vasos sanguíneos como linfáticos. El crecimiento de los vasos puede ser utilizado en el tratamiento de, por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares. Además, las proteínas de fusión que muestran actividad antagónica en este análisis pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades, trastornos y/o afecciones que implican angiogénesis, actuando como un agente anti-vascular (p. ej., anti-angiogénesis). Estas enfermedades, trastornos y/o afecciones son conocidos en la técnica y/o se describen en la presente memoria, tal como, por ejemplo, tumores malignos, tumores sólidos, tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias, y granulomas piógenos; placas arterioscleróticas; enfermedades oculares angiogénicas, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis, retinoblastoma, uveítis y pterigión (crecimiento anormal de los vasos sanguíneos) del ojo; artritis reumatoide; psoriasis; retraso en la cicatrización de heridas; endometriosis; vasculogénesis; granulaciones; cicatrices hipertróficas (queloides); fracturas sin unión; esclerodermia; tracomia; adherencias vasculares; angiogénesis miocárdica; colaterales coronarias; colaterales cerebrales; malformaciones arteriovenosas; angiogénesis de extremidades isquémicas; Síndrome de Osier-Webber; 35 neovascularización de la placa; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; displasia fibromuscular; granulación de heridas; enfermedad de Crohn; y aterosclerosis. Por otra parte, las proteínas de fusión de albúmina que actúan como antagonistas en este análisis pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades anti-hiperproliferativas y/o anti-inflamatorias conocidas en la técnica y/o descritas en la presente memoria.

Ejemplo 38: Expresión de moléculas de adherencia celular (CAM) en células endoteliales

- 40 El reclutamiento de linfocitos a las áreas de inflamación y angiogénesis implica interacciones receptor-ligando específicas entre moléculas de adherencia de la superficie celular (CAM) en los linfocitos y el endotelio vascular. El proceso de adherencia, tanto en entornos normales como patológicos, sigue una cascada de múltiples etapas que implica la expresión de la molécula de adherencia intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adherencia celular vascular 1 (VCAM-I), y la molécula de adherencia leucocitaria al endotelio 1 (E-selectina) en las células endoteliales (EC). La expresión de estas moléculas y otras en el endotelio vascular determina la eficacia con que los leucocitos se pueden adherir a la vasculatura local y extravasarse al tejido local durante el desarrollo de una respuesta inflamatoria. La concentración local de citoquinas y factor de crecimiento participan en la modulación de la expresión de estas CAM.

- 50 Brevemente, las células endoteliales (p. ej., células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC)) se cultivan en una placa convencional de 96 pocillos hasta la confluencia, el medio de cultivo se retira de las células y se reemplaza por 100 µl de Medio 199 (suero bovino fetal (FBS) al 10%). Las muestras para el ensayo (que contiene una proteína de fusión de albúmina de la invención) y los controles positivos o negativos se agregan a la placa por triplicado (en volúmenes de 10 µl). Las placas se incuban a 37°C, ya sea durante 5 h (expresión de selectina e integrina) o 24 h (expresión de integrina solamente). Las placas se aspiran para eliminar el medio y se añade a cada pocillo 100 µl de paraformaldehído al 0,1%-PBS (con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺). Las placas se mantienen a 4°C durante 30 min. El fijador se elimina de los pocillos y los pocillos se lavan 1X con PBS (+Ca,Mg) + BSA al 0,5% y se drenan. Se añaden a los pocillos de ensayo y de control 10 µl de anticuerpo primario diluido. Se utilizan anti-ICAM-1-Biotina, anti-VCAM-1-Biotina y Anti-E-selectina-Biotina a una concentración de 10 µg/mL (dilución 1:10 de anticuerpo de partida de 0,1 mg/mL). Las células se incuban a 37°C durante 30 min. en un ambiente humidificado. Los pocillos se lavan tres veces con PBS (+Ca,Mg) + 0,5% de BSA. Se añaden a cada pocillo 20 µl de ExtrAvidin-fosfatasa alcalina

diluida (dilución 1:5000, referida en la presente memoria como dilución de trabajo) y se incuban a 37°C durante 30 min. Los pocillos se lavan tres veces con PBS (+Ca,Mg) + BSA al 0,5%. Se disuelve 1 comprimido de fosfato p-nitrofenol pNPP por cada 5 mL de tampón de glicina (pH 10,4). Se añaden a cada pocillo de ensayo 100 µl de sustrato pNPP en tampón glicina. Se preparan pocillos convencionales, por triplicado, a partir de la dilución de trabajo de la ExtrAvidin-fosfatasa alcalina en tampón de glicina: 1:5000 (10^0) > $10^{-0.5}$ > 10^{-1} > $10^{-1.5}$. Se añaden 5 µl de cada dilución a pocillos por triplicado y el contenido de AP resultante en cada pocillo es 5,50 ng, 1,74 ng, 0,55 ng, 0,18 ng. A continuación se añaden 100 µl de reactivo pNPP a cada uno de los pocillos convencionales. La placa se incuba a 37°C durante 4 h. Se añade un volumen de 50 µl de NaOH 3M a todos los pocillos. La placa se lee en un lector de placas a 405 nm utilizando la opción de sustracción del fondo de los pocillos del blanco cargados solo con tampón de glicina. Además, se ajusta el molde para indicar la concentración de producto conjugado de AP en cada pocillo convencional [5,50 ng; 1,74 ng; 0,55 ng; 0,18 ng]. Los resultados se indican como cantidad de producto conjugado de AP unido en cada muestra.

Ejemplo 39: Análisis de proliferación de células endoteliales con Azul Alamar

Este análisis se puede utilizar para determinar cuantitativamente la inhibición mediada por proteína de la proliferación de Células Endoteliales Linfáticas Bovinas (LEC), Células Endoteliales Aórticas Bovinas (BAEC) o Células Miometríales Uterinas Microvasculares Humanas (UTMEC) inducida por bFGF. Este análisis incorpora un indicador de crecimiento fluorométrico basado en la detección de la actividad metabólica. Se prepara un análisis de proliferación con Azul Alamar convencional en EGM-2MV con 10 ng/mL de bFGF añadido como una fuente de estimulación de las células endoteliales. Este análisis se puede usar con una variedad de células endoteliales con ligeros cambios en el medio de crecimiento y la concentración celular. Las diluciones de los lotes de proteína que se van a someter a ensayo se diluyen según sea apropiado. Se utiliza medio libre de suero (GIBCO SFM) sin bFGF como control no estimulado y se incluyen angiostatina o TSP-I como controles inhibidores conocidos.

En resumen, se siembran LEC, BAEC o UTMEC en medio de cultivo a una densidad de 5.000 a 2.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se dejó a 37 grados Celsius durante la noche. Después de la incubación durante la noche de las células, el medio de crecimiento se retira y se reemplaza por EC-SFM GIBCO. Las células se tratan con las diluciones apropiadas de una proteína de fusión de albúmina de la invención o una o varias muestras de proteína de control (preparadas en SFM) en pocillos por triplicado con bFGF adicional a una concentración de 10 ng/mL. Una vez que las células han sido tratadas con las muestras, la placa o placas es/son colocadas de nuevo en la incubadora a 37°C durante tres días. Después de tres días se añaden 10 mL de azul alamar de partida (Biosource Núm. Cat. DAL 1100) a cada pocillo y la placa o las placas es/son colocadas de nuevo en la incubadora a 37°C durante cuatro horas. La placa o las placas se leen a continuación en 530 nm de excitación y 590 nm de emisión utilizando el lector de fluorescencia CytoFluor. La salida directa se registra en unidades de fluorescencia relativa.

El azul Alamar es un indicador de oxidación-reducción que emite fluorescencia y cambia de color en respuesta a la reducción química del medio de crecimiento resultante del crecimiento celular. A medida que las células crecen en cultivo, la actividad metabólica innata da como resultado una reducción química del entorno circundante inmediato. La reducción relacionada con el crecimiento hace que el indicador cambie de la forma oxidada (azul no fluorescente) a la forma reducida (rojo fluorescente) (es decir, la proliferación estimulada producirá una señal más fuerte y la proliferación inhibida producirá una señal más débil y la señal total es proporcional al número total de células, así como a su actividad metabólica). El nivel de fondo de la actividad se observa con el medio en condiciones de privación de nutrientes. Esto se compara con la salida observada de las muestras de control positivas (bFGF en el medio de crecimiento) y las diluciones de proteína.

Ejemplo 40: Detección de la inhibición de una reacción mixta de linfocitos

Este análisis se puede usar para detectar y evaluar la inhibición de una Reacción Mixta de Linfocitos (MLR) por las proteínas de fusión de la invención. La inhibición de una MLR puede ser debida a un efecto directo sobre la proliferación y la viabilidad celular, la modulación de moléculas coestimuladoras en las células que interactúan, la modulación de adherencia entre linfocitos y células accesorias, o la modulación de la producción de citoquinas por las células accesorias. Múltiples células pueden ser la diana de las proteínas de fusión de albúmina que inhiben la MLR ya que la fracción mononuclear de sangre periférica utilizada en este análisis incluye linfocitos T, B y asesinos naturales, así como monocitos y células dendríticas.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención que se ha encontrado que inhiben la MLR pueden encontrar aplicación en enfermedades asociadas con la activación o proliferación de linfocitos y monocitos. Estas incluyen, pero no se limitan a, enfermedades tales como asma, artritis, diabetes, afecciones inflamatorias de la piel, psoriasis, eczema, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, arteriosclerosis, cirrosis, enfermedad de injerto contra anfitrión, enfermedad de anfitrión contra injerto, hepatitis, leucemia y linfoma.

En resumen, las PBMC de donantes humanos se purifican mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Medio de Separación de Linfocitos (LSM[®], densidad 1,0770 g/mL, Organon Teknika Corporation, West Chester, PA). Las PBMC de dos donantes se ajustan a 2×10^6 células/mL en RPMI-1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) con un suplemento de FCS al 10% y glutamina 2 mM. Las PBMC de un tercer donante se ajustan a $2 \times$

10⁵ células/mL. Se añaden 50 µl de PBMC de cada donante a los pocillos de una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos. Se añaden diluciones de la sustancia de ensayo proteína de fusión (50 µl) por triplicado a pocillos de microtitulación. Se añaden muestras de ensayo (de la proteína de interés) para la dilución final de 1:4; se añade rhIL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, número de catálogo 202-IL) a una concentración final de 1 µg/mL; anti-CD4 mAb (R&D Systems, clon 34930.11, número de catálogo MAB379) a una concentración final de 10 µg/mL. Las células se cultivan durante 7-8 días a 37°C en CO₂ al 5%, y se añade 1 µCi de [³H] timidina a los pocillos durante las últimas 16 horas de cultivo. Las células se recogen y se determina la incorporación de timidina utilizando un Packard TopCount. Los datos se expresan como la media y la desviación típica de determinaciones por triplicado.

Las muestras de la proteína de fusión de interés se escrutan en experimentos separados y se comparan con el tratamiento de control negativo, mAb anti-CD4, que inhibe la proliferación de linfocitos y el tratamiento de control positivo, IL-2 (ya sea como sustancia recombinante o sobrenadante), lo que aumenta la proliferación de linfocitos.

Ejemplo 41: Análisis para determinar la actividad proteasa

El siguiente análisis se puede utilizar para evaluar la actividad proteasa de una proteína de fusión de albúmina de la invención.

Se realizó una zimografía de gelatina y caseína esencialmente como se ha descrito (Heusen et al., Anal. Biochem., 102:196-202 (1980); Wilson et al., Journal of Urology, 149:653-658 (1993)). Las muestras se ejecutan en geles de poliacrilamida al 10%/SDS al 0,1% que contienen gelatina o caseína al 1%, empapados en Triton al 2,5% a temperatura ambiente durante 1 hora y, en glicina 0,1 M, pH 8,3 a 37°C durante 5 a 16 horas. Después de la tinción con negro amido aparecen zonas de proteólisis en forma de zonas claras frente al fondo de color azul-negro. La tripsina (Sigma T8642) se utiliza como control positivo.

La actividad proteasa se determina también mediante el control de la escisión de éster etílico de n-a-benzoyl-L-arginina (BAEE) (Sigma B-4500). Las reacciones se establecieron en (NaPO₄ 25 mM, EDTA 1 mM, y BAEE 1 mM), pH 7,5. Se añaden las muestras y el cambio en la absorbancia a 260 nm se controla en el espectrofotómetro Beckman DU-6 en el modo accionado por tiempo. La tripsina se utiliza como control positivo.

Los análisis adicionales en base a la liberación de péptidos solubles en ácido a partir de caseína o hemoglobina medida como la absorbancia a 280 nm o colorimétricamente utilizando el método de Folin se llevan a cabo como describen Bergmeyer, et al., en Methods of Enzymatic Analysis, 5 (1984). Otros análisis implican la solubilización de sustratos cromogénicos (Ward, Applied Science, 251-317 (1983)).

Ejemplo 42: Identificación de la especificidad de sustrato de la serina proteasa

Los métodos conocidos en la técnica o descritos en la presente memoria se pueden utilizar para determinar la especificidad de sustrato de las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención que tienen actividad serina proteasa. Un método preferido para la determinación de la especificidad de sustrato es mediante el uso de bibliotecas combinatorias sintéticas de barrido posicional como se describe en el documento GB 2 324 529 (incorporado a la presente memoria en su totalidad).

Ejemplo 43: Análisis de unión al ligando

El siguiente análisis se puede utilizar para evaluar la actividad de unión al ligando de una proteína de fusión de albúmina de la invención.

Los análisis de unión a ligando proporcionan un método directo para determinar la farmacología del receptor y son adaptables a un formato de alto rendimiento. El ligando purificado de una proteína de fusión de albúmina de la invención está radiomarcado con alta actividad específica (50-2000 Ci/mmol) para los estudios de unión. A continuación se realiza la determinación de que el procedimiento de radiomarcado no disminuye la actividad del ligando hacia la proteína de fusión. Las condiciones de análisis para tampones, iones, el pH y otros moduladores tales como nucleótidos se optimizan para establecer una señal viable con respecto a la proporción de ruido para fuentes de polipéptidos tanto de membrana como de células completas. Para estos análisis, la unión del polipéptido específico se define como la radiactividad total asociada menos la radioactividad medida en presencia de un exceso de ligando competitivo no marcado. Siempre que sea posible, se utiliza más de un ligando competitivo para definir la unión no específica residual.

Ejemplo 44: Análisis funcional en ovocitos de *Xenopus*

Se sintetizan in vitro transcritos de ARN protegidos terminalmente a partir de moldes de plásmido linealizado que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención con ARN polimerasas de acuerdo con procedimientos convencionales. Los transcritos in vitro se suspenden en agua a una concentración final de 0,2 mg/ml. Los lóbulos ováricos se retiran de sapos hembra adultos, se obtienen ovocitos desfolliculados en Fase V, y los transcritos de ARN (10 ng/ovocito) se inyectan en un bolo de 50 nl utilizando un aparato de microinyección. Se usa una abrazadera de voltaje con dos electrodos para medir las corrientes desde los ovocitos de *Xenopus* individuales en respuesta a la exposición a la proteína de fusión y al agonista polipeptídico. Las grabaciones se realizan en medio de Barth libre de

Ca²⁺ a temperatura ambiente. El sistema de *Xenopus* se puede usar para escrutar ligandos conocidos y extractos de tejido/célula para la activación de ligandos.

Ejemplo 45: Análisis microfisiométricos

La activación de una amplia variedad de sistemas de mensajero secundario da como resultado la extrusión de pequeñas cantidades de ácido desde una célula. El ácido formado es en gran parte como resultado de la mayor actividad metabólica necesaria para alimentar el proceso de señalización intracelular. Los cambios de pH en el medio que rodea la célula son muy pequeños pero son detectables por el microfisiómetro CYTOSENSOR (Molecular Devices Ltd., Menlo Park, Calif.). El CYTOSENSOR es por lo tanto capaz de detectar la capacidad de una proteína de fusión de albúmina de la invención para activar mensajeros secundarios que se acoplan a una energía que utiliza la ruta de señalización intracelular.

Ejemplo 46: Escrutinio del extracto/sobrenadante celular

Existe un gran número de receptores de mamíferos para los queda, todavía, ligando activador no cognado (agonista). Por lo tanto, los ligandos activos para estos receptores pueden no estar incluidos dentro de los bancos de ligandos identificados hasta la fecha. Por consiguiente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden seleccionar funcionalmente (utilizando calcio, AMPc, microfisiómetro, electrofisiología de ovocitos, etc., escrutinios) en contra de los extractos de tejido para identificar ligandos naturales para la porción de proteína terapéutica y/o la porción de la proteína albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Los extractos que producen respuestas funcionales positivas se pueden subfraccionar sucesivamente hasta que se aísla e identifica un ligando de activación.

Ejemplo 47: Análisis de unión a ATP

El siguiente análisis se puede utilizar para evaluar la actividad de unión a ATP de las proteínas de fusión de la invención.

La actividad de unión a ATP de una proteína de fusión de albúmina de la invención se puede detectar utilizando el análisis de unión a ATP descrito en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.858.719, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. En pocas palabras, la unión a ATP de una proteína de fusión de albúmina de la invención se mide a través de marcaje de fotoafinidad con 8-azido-ATP en un análisis de competición. Las mezclas de reacción que contienen 1 mg/mL de proteína de transporte ABC se incuban con diferentes concentraciones de ATP, o el análogo no hidrolizable de ATP adenil-5'-imidodifosfato durante 10 minutos a 4°C. Se añade una mezcla de 8-azido-ATP (Sigma Chem. Corp., St. Louis, MO.) más 8-azido-ATP (³²P-ATP) (5 mCi/mmol, ICN, Irvine CA.) a una concentración final de 100 mM y se colocan alícuotas de 0,5 mL en los pocillos de una placa de toque de porcelana sobre hielo. La placa se irradia utilizando una lámpara UV a 254 nm de onda corta a una distancia de 2,5 cm desde la placa durante dos intervalos de un minuto, intercalando intervalos de enfriamiento de un minuto. La reacción se detuvo mediante adición de ditiotreitolo a una concentración final 2 mM. Las incubaciones se someten a electroforesis en SDS-PAGE, se secan, y se autorradiografian. Las bandas de proteína correspondientes a las proteínas de fusión de albúmina de la invención se escinden, y se cuantifica la radiactividad. Una disminución de la radiactividad con aumento de ATP o de adenil-5'-imidodifosfato proporciona una medida de la afinidad ATP por la proteína de fusión.

Ejemplo 48: Identificación de proteínas de transducción de señales que interactúan con una proteína de fusión de albúmina de la presente invención

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden servir como herramientas de investigación para la identificación, caracterización y purificación de proteínas de la ruta de transducción de señales o proteínas receptoras. En resumen, una proteína de fusión marcada de la invención es útil como un reactivo para la purificación de moléculas con las que interactúa. En una realización de purificación por afinidad, una proteína de fusión de albúmina de la invención se acopla covalentemente a una columna de cromatografía. El extracto sin células derivado de las supuestas células diana, tales como tejidos de carcinoma, se hace pasar sobre la columna, y las moléculas con afinidad adecuada se unen a la proteína de fusión de albúmina. El complejo de la proteína se recupera de la columna, se disocia, y la molécula recuperada se somete a secuenciación de proteínas N-terminal. Esta secuencia de aminoácidos se utiliza a continuación para identificar la molécula capturada o para diseñar sondas de oligonucleótidos degenerados para la clonación del gen relevante a partir de una biblioteca de ADNc apropiada.

Ejemplo 49: Bioanálisis de IL-6

Una variedad de análisis son conocidos en la técnica para someter a ensayo los efectos proliferativos de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Por ejemplo, uno de tales análisis es el Bioanálisis de IL-6 como describen Marz et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 95:3251-56 (1998), que se incorpora a la presente memoria como referencia). Después de 68 horas a 37°C, el número de células viables se mide mediante la adición de la sal de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT) y la incubación durante otras 4 horas a 37°C. Las células B9 se lisan mediante SDS y la densidad óptica se mide a 570 nm. Se utilizan controles que contienen IL-6 (positivo) y sin citoquina (negativo). En resumen, células murinas B9 dependientes de IL-6 se lavan tres veces en medio libre de IL-6 y se

siembran a una concentración de 5.000 células por pocillo en 50 µl, y se añaden 50 µl de proteína de fusión de la invención. El aumento de proliferación en la muestra o muestras de ensayo (que contienen una proteína de fusión de albúmina de la invención) en relación con el control negativo es indicativo de efectos proliferativos mediados por la proteína de fusión.

5 **Ejemplo 50: Ayuda a la supervivencia de neuronas de embrión de pollo**

Para probar si la viabilidad de las células neuronales simpáticas se apoya en una proteína de fusión de albúmina de la invención, se puede utilizar el análisis de supervivencia neuronal de embrión de pollo de Senaldi et al (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 96:11458-63 (1998), que se incorpora a la presente memoria como referencia). En pocas palabras, neuronas motoras y simpáticas se aíslan a partir de embriones de pollo, se resuspenden en medio L15 (con FCS al 10%, glucosa, selenito de sodio, progesterona, conalbumina, putrescina, e insulina; Life Technologies, Rockville, MD.) y medio de Eagle modificado por Dulbecco [con FCS al 10%, glutamina, penicilina, y tampón Hepes 25 mM (pH 7,2); Life Technologies, Rockville, MD.], respectivamente, y se incuban a 37°C en CO₂ al 5% en presencia de diferentes concentraciones de la proteína de fusión purificada de la invención, así como de un control negativo carente de cualquier citoquina. Después de 3 días, la supervivencia neuronal se determina mediante evaluación de la morfología celular, y mediante el uso del análisis colorimétrico de Mosmann (Mosmann, T., J. Immunol Methods, 65:55-63 (1983)). El aumento de la viabilidad celular neuronal en comparación con los controles que carecen de citoquina es indicativo de la capacidad de la proteína de fusión de albúmina para mejorar la supervivencia de las células neuronales.

Ejemplo 51: Análisis de la actividad fosfatasa

20 El siguiente análisis se puede usar para evaluar la actividad serina/treonina fosfatasa (PTPasa) de una proteína de fusión de albúmina de la invención.

Con el fin de analizar la actividad serina/treonina fosfatasa (PTPasa), se pueden utilizar análisis que son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la actividad serina/treonina fosfatasa (PSPasa) de una proteína de fusión de albúmina de la invención se puede medir utilizando un kit de ensayo PSPasa de New England Biolabs, Inc. La proteína básica de mielina (MyBP), un sustrato para la PSPasa, se fosforila los residuos de serina y treonina con la Proteína Quinasa dependiente de AMPc en presencia de ³²[P]ATP. La actividad de la proteína serina/treonina fosfatasa se determina a continuación mediante la medición de la liberación de fosfato inorgánico a partir MyBP marcada con 32P.

Ejemplo 52: Interacción de serina/treonina fosfatasas con otras proteínas

30 Las proteínas de fusión de la invención que tienen actividad serina/treonina fosfatasa (p. ej., según se determina en el Ejemplo 51) son útiles, por ejemplo, como herramientas de investigación para la identificación, caracterización y purificación de proteínas de interacción o proteínas receptoras adicionales, u otra proteínas de la ruta de transducción de señales. En resumen, una proteína de fusión marcada de la invención es útil como un reactivo para la purificación de moléculas con las que interactúa. En una realización de purificación por afinidad, una proteína de fusión de albúmina de la invención se acopla covalentemente a una columna de cromatografía. El extracto libre de células derivado de las supuestas células diana, tales como células neuronales o del hígado, se hace pasar sobre la columna, y las moléculas con afinidad adecuada se unen a la proteína de fusión. El complejo de proteína de fusión se recupera de la columna, se disocia, y la molécula recuperada se somete a secuenciación de la proteína N-terminal. Esta secuencia de aminoácidos se utiliza después para identificar la molécula capturada o para diseñar sondas de oligonucleótidos degenerados para la clonación del gen relevante a partir de una biblioteca de ADNc apropiada.

Ejemplo 53: Análisis de la actividad heparanasa

Existen numerosos análisis conocidos en la técnica que se puede emplear para someter a ensayo la actividad heparanasa de una proteína de fusión de albúmina de la invención. En un ejemplo, la actividad heparanasa de una proteína de fusión de albúmina de la invención se somete a ensayo como describen Vlodavsky et al., (Vlodavsky et al., Nat. Med., 5:793-802 (1999)). En resumen, los productos lisados celulares, el medio acondicionado, las células intactas (1 x 10⁶ células por placa de 35 mm), el sobrenadante de cultivo celular, o la proteína de fusión purificada se incuban durante 18 horas a 37°C, pH 6,2 a 6,6, con MEC marcada con ³⁵S- o MEC soluble derivada del pico I proteoglicanos. El medio de incubación se centrifuga y el sobrenadante se analiza mediante filtración en gel en una columna de Sefarosa CL-6B (0,9 x 30 cm). Las fracciones se eluyen con PBS y se mide su radiactividad. Los fragmentos de degradación de las cadenas laterales de sulfato de heparán se hacen eluir en Sefarosa 6B en 0,5 <K_{av} < 0,8 (pico II). Cada experimento se realiza al menos tres veces. Los fragmentos de degradación correspondientes al "pico II", como describen por Vlodavsky et al., son indicativos de la actividad de una proteína de fusión de albúmina de la invención en la escisión de heparán sulfato.

55 **Ejemplo 54: Inmovilización de biomoléculas**

Este ejemplo proporciona un método para la estabilización de una proteína de fusión de albúmina de la invención en constructos de bicapa lipídica de células no anfitrionas celular (véase, por ejemplo, Bieri et al., Nature Biotech.

17:1105-1108 (1999), que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad) que puede ser adaptado para el estudio de proteínas de fusión de la invención en los diversos análisis funcionales descritos anteriormente. En resumen, la química de carbohidratos específica para biotinylation se utiliza para confinar una etiqueta de biotina a una proteína de fusión de albúmina de la invención, permitiendo de este modo la orientación uniforme después de la inmovilización. Una solución 50 μ M de una proteína de fusión de albúmina de la invención en membranas lavadas se incuba con NaIO_4 20 mM y 1,5 mg/mL (4 mM) de BACH o 2 mg/mL (7,5 mM) de biotina-hidrazida durante 1 hora a temperatura ambiente (volumen de reacción, 150 μ l). A continuación, la muestra se somete a diálisis (Pierce Slidealizer Cassett, corte a 10 kDa; Pierce Chemical Co., Rockford IL) a 4°C primero durante 5 h, cambiando el tampón después de cada hora, y finalmente durante 12 h contra 500 mL de tampón R (NaCl 0,15 M, MgCl_2 1 mM, fosfato de sodio 10 mM, pH 7). Inmediatamente antes de la adición a una cubeta, la muestra se diluyó 1:5 en tampón ROG50 (Buffer R con un suplemento de octilglucósido 50 mM).

Ejemplo 55: Análisis para determinar la actividad metaloproteinasas

Las metaloproteinasas son hidrolasas peptídicas que utilizan iones metálicos, tales como Zn^{2+} , como mecanismo catalítico. La actividad metaloproteinasas de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención se puede someter a ensayo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Se proporcionan los siguientes métodos ilustrativos:

Proteólisis de la alfa-2-macroglobulina

Para confirmar la actividad proteasa, una proteína de fusión purificada de la invención se mezcla con el sustrato de alfa-2-macroglobulina (0,2 unidad/mL; Boehringer Mannheim, Alemania) en tampón de análisis 1x (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,2 M, CaCl_2 10 mM, ZnCl_2 25 mM y Brij-35 al 0,05%) y se incuba a 37°C durante 1-5 días. La tripsina se utiliza como control positivo. Los controles negativos solo contienen alfa-2-macroglobulina en tampón de análisis. Las muestras se recogen y se hierven en tampón de muestra de SDS-PAGE que contiene 2-mercaptoetanol al 5% durante 5 min, a continuación se cargan en gel de SDS-poliacrilamida al 8%. Después de la electroforesis, las proteínas se visualizan mediante tinción con plata. La proteólisis es evidente por la aparición de bandas de peso molecular inferior en comparación con el control negativo.

Inhibición de la proteólisis de alfa-2-macroglobulina por los inhibidores de las metaloproteinasas

También se pueden utilizar inhibidores de metaloproteinasas conocidos (quelantes de metales (EDTA, EGTA, y HgCl_2), inhibidores de péptidos de la metaloproteinasas (TIMP-I y TEVIP-2), e inhibidores de MMP de molécula pequeña comerciales) para caracterizar la actividad proteolítica de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Tres inhibidores de MMP sintéticos que se pueden utilizar son: inhibidor I de MMP, [CI_{50} = 1,0 μ M contra MMP-1 y MMP-8; CI_{50} = 30 μ M contra MMP-9; CI_{50} = 150 μ M contra MMP-3]; inhibidor II de MMP-3 (estromelisin-1) [CI_{50} = 5 M contra MMP-3], e inhibidor III de MMP-3 [K_i = 130 nM contra MMP-3]; inhibidores disponibles de Calbiochem, Núm. de catálogo 444250, 444218, y 444225, respectivamente). En pocas palabras, se mezclan diferentes concentraciones de los inhibidores de MMP de molécula pequeña con una proteína de fusión purificada de la invención (50 μ g/mL) en 22,9 μ l de tampón de 1x HEPES (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,2 M, CaCl_2 10 mM, ZnCl_2 25 μ M y Brij-35 al 0,05%) y se incuban a temperatura ambiente (24°C) durante 2 horas, a continuación, se añaden 7,1 μ l de sustrato de alfa-2-macroglobulina (0,2 unidades/mL) y se incuban a 37°C durante 20 horas. Las reacciones se detienen mediante la adición de tampón de muestra 4x y se hierven inmediatamente durante 5 minutos. Después de la SDS-PAGE, las bandas de proteína se visualizan mediante tinción de plata.

Análisis de escisión de sustratos peptídicos fluorogénicos sintéticos

La especificidad de sustrato para las proteínas de fusión de la invención con actividad metaloproteinasas demostrada puede determinarse utilizando mecanismos conocidos en la técnica, tales como el uso de sustratos peptídicos fluorogénicos sintéticos (adquiridos de Bachem Bioscience Inc). Los sustratos de ensayo incluyen, M-1985, M-2225, M-2105, M-2110 y M-2255. Los cuatro primeros son sustratos de MMP y el último es un sustrato de la enzima de conversión de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (TACE). Estos sustratos se preparan preferiblemente en dimetil sulfoxido 1:1 (DMSO) y agua. Las soluciones de partida son 50-500 mM. Los análisis fluorescentes se llevan a cabo mediante el uso de un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS 50B equipado con un baño de agua a temperatura constante. La λ de excitación es a 328 nm y la λ de emisión es a 393 nm. En resumen, el análisis se lleva a cabo incubando 176 μ l de tampón de 1x HEPES (NaCl 0,2 M, CaCl_2 10 mM, Brij-35 al 0,05% y HEPES 50 mM, pH 7,5) con 4 μ l de solución de sustrato (50 μ M) a 25°C durante 15 minutos, y a continuación añadiendo 20 μ l de una proteína de fusión purificada de la invención a la cubeta de análisis. La concentración final de sustrato es 1 μ M. Las velocidades de hidrólisis iniciales se verifican durante 30 min.

Ejemplo 56: Aparición de diabetes en ratones NOD

Los ratones NOD hembra (diabéticos no obesos) se caracterizan por mostrar DMID con un curso que es similar al encontrado en los seres humanos, aunque la enfermedad es más pronunciada en ratones NOD hembra que los machos. De aquí en adelante, a menos que se indique lo contrario, el término "ratón NOD" se refiere a un ratón NOD hembra. Los ratones NOD tienen una destrucción progresiva de las células beta que es causada por una enfermedad autoinmunitaria crónica. Por lo tanto, los ratones NOD comienzan su vida con normoglucemia, o niveles

normales de glucosa en la sangre. A alrededor de 15 a 16 semanas de edad, sin embargo, los ratones NOD comienzan a ser hiperglucémicos, lo que indica la destrucción de la mayoría de sus células beta del páncreas y la correspondiente incapacidad del páncreas para producir suficiente insulina. Así, tanto la causa como el progreso de la enfermedad son similares a los pacientes DMID humanos.

5 Los análisis *in vivo* de eficacia de los regímenes de inmunización pueden ser evaluados en ratones hembra NOD/LtJ (disponible comercialmente de The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me.). En la bibliografía, se informa de que 80% de los ratones hembra desarrollan diabetes a las 24 semanas de edad y el inicio de la insulinitis comienza entre 6-8 semanas de edad. Los ratones NOD son endogámicos y altamente sensibles a una variedad de estrategias inmunorreguladoras. Los ratones NOD adultos (6-8 semanas de edad) tienen una masa media de 20 a 25 g.

10 Estos ratones pueden ser no tratados (control), tratados con los agentes terapéuticos de la presente invención (p. ej., proteínas de albúmina de fusión de la invención y fragmentos y variantes de los mismos), solos o combinados con otros compuestos terapéuticos mencionados anteriormente. El efecto de los diferentes tratamientos en el progreso de la diabetes se puede medir de la siguiente manera:

15 A las 14 semanas de edad, los ratones NOD hembra se puede fenotipificar de acuerdo con la tolerancia a la glucosa. La tolerancia a la glucosa se puede medir con la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT). En resumen, se extrae sangre del plexo paraorbital a los 0 minutos y a los 60 minutos después de la inyección intraperitoneal de glucosa (1 g/kg de peso corporal). La tolerancia normal se define como la glucosa en plasma a los 0 minutos de menos de 144 mg %, o a los 60 minutos de menos de 160 mg %. Los niveles de glucosa en sangre se determinan con un aparato Glucometer Elite.

20 En base a este análisis fenotípico, los animales se pueden asignar a los diferentes grupos experimentales. En particular, los animales con los niveles más elevados de glucosa en sangre se pueden asignar al grupo de tolerancia alterada a la glucosa. Los ratones pueden ser alimentados *ad libitum* y se les puede suministrar agua acidulada (pH 2,3).

25 Los ratones tolerantes e intolerantes a la glucosa se pueden subdividir adicionalmente en control, proteínas de fusión de albúmina de la presente invención, y grupos de combinación de proteínas de fusión de albúmina/compuestos terapéuticos. Los ratones en el grupo control pueden recibir una inyección intraperitoneal de vehículo al día, seis veces por semana. Los ratones en el grupo de fusión de albúmina puede recibir una inyección intraperitoneal de los agentes terapéuticos de la presente invención (p. ej., proteínas de fusión de albúmina de la invención y fragmentos y variantes de los mismos) en vehículo al día, seis veces por semana. Los ratones en el grupo de combinación de proteínas de fusión de albúmina/compuestos terapéuticos pueden recibir tanto las proteínas de fusión de albúmina como las combinaciones de compuestos terapéuticos como se describe anteriormente.

30 El nivel de glucosa en la orina de los ratones NOD se puede determinar de forma quincenal utilizando Labstix (Bayer Diagnostics, Hampshire, Inglaterra). El peso y la ingesta de líquidos también se pueden determinar de forma quincenal. La aparición de la diabetes se produce después de la aparición de glucosuria en dos determinaciones consecutivas. Después de 10 semanas de tratamiento, se puede realizar una IPGTT adicional y los animales se pueden sacrificar el día siguiente.

35 En el curso 10 semanas de tratamiento, los animales de control en los grupos tolerantes la glucosa e intolerantes a la glucosa desarrollan diabetes en una proporción de 60% y 86%, respectivamente (véase la patente de Estados Unidos Núm. 5.866.546, Gross et al.). Por lo tanto, se producen altas tasas de diabetes incluso en los ratones NOD que inicialmente son tolerantes a la glucosa si no se realiza ninguna intervención.

40 Los resultados se pueden confirmar mediante la medición de los niveles de glucosa en sangre en ratones NOD, antes y después del tratamiento. Los niveles de glucosa en la sangre se miden como se describe anteriormente tanto en ratones tolerantes como intolerantes a la glucosa en todos los grupos descritos.

45 En una realización alternativa, los agentes terapéuticos de la presente invención (p. ej., fusiones específicas descritas como SEQ ID NO: Y y fragmentos y variantes de los mismos) se pueden cuantificar utilizando análisis espectrométrico y las cantidades de proteínas adecuadas se pueden resuspender antes de la inyección en 50 µl de solución salina tamponada fosfato (PBS) por dosis. Se pueden administrar dos inyecciones, con una semana de diferencia, por vía subcutánea debajo de la piel dorsal de cada ratón. El seguimiento puede llevarse a cabo en dos ocasiones separadas antes de la inmunización y se puede realizar semanalmente durante todo el tratamiento y
50 continuar después de eso. La orina se puede someter a ensayo para determinar la glucosa cada semana (Keto Diastix.RTM.; Miles Inc., Kankakee, Ill.) y los ratones glicosúricos se pueden comprobar para determinar la glucosa en suero (ExacTech.RTM., MediSense, Inc., Waltham, Mass.). La diabetes se diagnostica cuando la glucemia en ayunas es superior a 2,5 g/l.

Ejemplo 57: Examen histológico de los ratones NOD

55 El examen histológico de muestras de tejido de los ratones NOD puede demostrar la capacidad de las composiciones de la presente invención, y/o una combinación de las composiciones de la presente invención con otros agentes terapéuticos para la diabetes, para aumentar la concentración relativa de células beta en el páncreas.

El método experimental es el siguiente:

Los ratones del Ejemplo 56 se pueden sacrificar al final del período de tratamiento y las muestras de tejido se pueden tomar del páncreas. Las muestras se pueden fijar en formalina al 10% en solución salina al 0,9% y embeber en cera. Se pueden cortar dos series de 5 secciones de 5 .mu.m para el inmunomarcaje en un intervalo de corte de 150 .mu.m. Las secciones se pueden inmunomarcar para determinar la insulina (dilución 1:1000 de antisueros anti-insulina de cobaya, ICN Thames Reino Unido) y el glucagón (dilución 1: 2000 de antisuero de conejo anti-glucagón pancreático) y se detectan con peroxidasa conjugada anti-cobaya (Dako, High Wycombe, Reino Unido) o anti-antisuero de conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:50, Dako).

La composición de la presente invención pueden tener o pueden no tener un efecto tan fuerte sobre la masa visible de las células beta como lo hace sobre las manifestaciones clínicas de diabetes en animales tolerantes a la glucosa e intolerantes a la glucosa.

Ejemplo 58: Modelo de ratón in vivo de DMNID

Se pueden obtener ratones macho C57BL/6J de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) a las 3 semanas de edad y alimentar con pienso convencional o dietas enriquecidas en cualquiera de grasa convencional (35,5% en p/p; Bioserv. Frenchtown, NJ) o fructosa (60% peso/peso; Harlan Teklad, Madison, WI). El pienso normal se compone de 4,5% en p/p de grasa, 23% en p/p de proteína, 31,9% en p/p de almidón, 3,7% en p/p fructosa, y 5,3% en p/p de fibra. La dieta con alto contenido de grasa (manteca de cerdo) se compone de 35,5% en p/p de grasa, 20% en p/p de proteína, 36,4% en p/p de almidón, 0,0% en p/p de fructosa, y 0,1% en p/p de fibra. La dieta de alto contenido de fructosa se compone de 5% en p/p de grasa, 20% en p/p de proteína, 0,0% en p/p de almidón, 60% en p/p de fructosa, y 9,4% en p/p de fibra. Los ratones pueden ser alojados no más de cinco por jaula a 22° +/- 3°C de temperatura y 50% +/-20% de humedad ambiente controlada con un ciclo de luz (06 a.m.-6 p.m.)/oscuridad de 12 horas (Luo et al., 1998, Metabolism 47(6):663-8, "Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus"; Larsen et al., Diabetes 50(11): 2530-9 (2001), "Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats"). Después de la exposición a las dietas respectivas durante 3 semanas, a los ratones se les pueden inyectar intraperitonealmente estreptozotocina, "STZ" (Sigma, St. Louis, MO), a 100 mg/kg de peso corporal o vehículo (ácido cítrico de 0,05 moles/l, pH 4,5) y mantener la misma dieta durante los siguientes 4 semanas. En condiciones postprandiales, se obtuvo sangre 1, 2 y 4 semanas después de la STZ pellizcando la parte distal de la cola. Las muestras se utilizan para medir las concentraciones postprandiales de glucosa e insulina en plasma. El peso corporal y la ingesta de alimentos se registran semanalmente.

Para determinar directamente el efecto de la dieta con alto contenido de grasa sobre la capacidad de la insulina para estimular la utilización de glucosa, los experimentos se pueden iniciar en tres grupos de ratones, los alimentados con grasa, los alimentados con pienso a los que se inyecta vehículo, y los alimentados con grasa a los que se inyecta STZ al final del período de 7 semanas descrito anteriormente. Los ratones pueden estar en ayunas durante 4 horas antes de los experimentos. En la primera serie de experimentos, los ratones pueden ser anestesiados con inhalación de metoxiflurano (Pitman-Moor, Mundelein, IL). Se puede inyectar insulina regular (Sigma) por vía intravenosa ([IV] a 0,1 U/kg de peso corporal) a través de una vena de la cola, y la sangre se puede recoger 3, 6, 9, 12, y 15 minutos después de la inyección de una vena de la cola diferente. Las concentraciones de glucosa en plasma se pueden determinar en estas muestras, y la vida media (t1/2) de la desaparición de la glucosa del plasma se puede calcular utilizando WinNonlin (Scientific Consulting, Apex, Carolina del Norte), un programa de soporte lógico de farmacocinética/farmacodinámica.

En la segunda serie de experimentos, los ratones pueden ser anestesiados con pentobarbital sódico intraperitoneal (Sigma). Se abre la cavidad abdominal y la vena abdominal principal se expone y se cateteriza con un catéter IV de calibre 24 (Johnson-Johnson Medical, Arlington, TX). El catéter se asegura al tejido muscular adyacente a la vena abdominal, se corta en la parte inferior de la conexión de la jeringa, y se conecta a un tubo de plástico PE50 precargado, que a su vez está conectado a una jeringa con una solución de infusión. La cavidad abdominal se cierra mediante sutura. Con este enfoque, no habría ninguna obstrucción del flujo de retorno de la sangre desde la parte inferior del cuerpo. Los ratones pueden ser infundidos continuamente con glucosa (24,1 mg/kg/min) e insulina (10 mU/kg/min) a un volumen de infusión de 10 µl/min. Las muestras de sangre retro-orbital (70 µl cada una) se pueden tomar de 90, 105, 120, y 135 minutos después del inicio de la infusión para la medición de las concentraciones de glucosa en plasma e insulina. La media de estas cuatro muestras se utiliza para estimar las concentraciones de glucosa en plasma (SSPG) y de insulina (SSPI) en estado estacionario para cada animal.

Finalmente, los experimentos para evaluar la capacidad de las proteínas de fusión de la albúmina, las composiciones terapéuticas de la presente solicitud, ya sea solas o combinadas con uno cualquiera o más de los fármacos terapéuticos enumerados para el tratamiento de diabetes mellitus, para disminuir la glucosa en plasma se puede realizar en los dos grupos siguientes de modelos de ratones "NDMID" a los que se inyecta STZ: (1) alimentados con grasa C57BL/6J, y (2) alimentados con fructosa C57BL/6J. Las concentraciones de glucosa en plasma de los ratones para estos estudios pueden oscilar de 255 hasta 555 mg/dL. Los ratones se asignan aleatoriamente al tratamiento con vehículo, agentes terapéuticos de fusión de albúmina de la presente invención, ya sea solos o combinados con uno cualquiera o más de los fármacos terapéuticos enumerados para el tratamiento de

la diabetes mellitus. Se pueden administrar un total de tres dosis. Se pueden tomar muestras de sangre de la vena de la cola para la medición de la concentración de glucosa plasmática antes de la primera dosis y 3 horas después de la dosis final.

- 5 Las concentraciones de glucosa en plasma se pueden determinar utilizando el Kit de Diagnóstico de Glucosa de Sigma (Sigma Núm. 315), un análisis colorimétrico de la enzima. Los niveles de insulina en plasma se pueden determinar utilizando el Kit RIA de insulina de Rata de Linco Research (Núm. RI-13K; St. Charles, MO).

Ejemplo 59: Análisis indicadores de H4IIE-SEAP in vitro que establecen la participación en la acción de la insulina

Los diversos informadores H4IIE

- 10 **H4IIE/rMEP-SEAP:** El promotor de la enzima málica aislado de rata (rMEP) contiene un elemento de PPAR-gamma, que está en la ruta de la insulina. Este constructo indicador se transfecta de forma estable a la línea celular H4IIE de hígado.

- 15 **H4IIE/SREBP-SEAP:** La proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-Ic) es un factor de transcripción que actúa sobre los promotores de una serie de genes sensibles a la insulina, por ejemplo, la sintetasa de ácidos grasos (FAS), y que regula la expresión de genes clave en el metabolismo de ácidos grasos en los fibroblastos, adipocitos, y hepatocitos. SREBP-Ic, también conocido como factor de determinación y diferenciación de los adipocitos I (ADD-1), se considera el principal mediador de los efectos de la insulina sobre la expresión génica en las células adiposas. Su actividad está modulada por los niveles de insulina, esteroides, y glucosa. Este constructo indicador se transfecta de forma estable a la línea celular H4IIE de hígado.

- 20 **H4IIE/FAS-SEAP:** Los constructos indicadores de ácido graso sintetasa contienen un promotor FAS sensible a SREBP mínimo. Este constructo indicador se transfecta de forma estable a la línea celular H4IIE de hígado.

- 25 **H4IIE/PEPCK-SEAP:** El promotor de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), es el sitio principal de la regulación hormonal de la actividad de PEPCK que modula la transcripción del gen PEPCK. El PEPCK cataliza un paso comprometido y limitante de la velocidad en la gluconeogénesis hepática y por lo tanto se debe controlar cuidadosamente para mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de límites normales. Este constructo indicador se transfecta de forma estable a la línea celular H4IIE de hígado.

- 30 Estos constructos indicadores también pueden ser transfectados de forma estable a fibroblastos 3T3-L1 y mioblastos L6. Estas líneas celulares estables se diferencian a continuación a adipocitos 3T3-L1 y miotubos L6 descritos anteriormente en el Ejemplo 13. Las líneas de células diferenciadas se pueden utilizar a continuación, en el análisis de SEAP descrito a continuación.

Crecimiento y medio de análisis

- 35 El medio de crecimiento comprende suero bovino fetal al 10% (FBS), Suero de Ternera al 10%, NEAA al 1%, 1x penicilina/estreptomicina y 0,75 mg/mL de G418 (para H4IIE/RFA-SEAP y H4IIE/SREBP-SEAP) o 0,50 mg/mL de G418 (para H4IIE/rMEP-SEAP). Para H4IIE/PEPCK-SEAP, el medio de cultivo consiste en FBS al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%, solución salina tamponada con HEPES 15 mM, y 0,50 mg/mL de G418.

El medio de análisis consiste en medio DMEM de bajo contenido de glucosa (Life Technologies), NEAA al 1%, 1x penicilina/estreptomicina para los indicadores H4IIE/RFA-SEAP, H4IIE/SREBP-SEAP, H4IIE/rMEP-SEAP. El medio de análisis para el indicador H4IIE/PEPCK-SEAP consiste en FBS al 0,1%, penicilina/estreptomicina al 1% y solución salina tamponada HEPES 15 mM.

40 **Método**

- Las placas de 96 pocillos se siembran a 75.000 células/pocillo en 100 µl/pocillo de medio de crecimiento hasta que las células en fase de crecimiento log se vuelven adherentes. Las células se mantienen en ayunas durante 48 horas mediante la sustitución del medio de crecimiento por medio de análisis, 200 µl/pocillo). (Para las células H4IIE/PEPCK-SEAP, se añade medio de análisis que contiene 0,5 µM de dexametasona a 100 µl/pocillo y se incuba durante aproximadamente 20 horas). El medio de análisis se sustituye después de eso por 100 µl/pocillo de medio de análisis de nueva aportación, y se añade al pocillo una alícuota de 50 µl de sobrenadante de células obtenido a partir de líneas celulares transfectadas que expresan los agentes terapéuticos de la presente invención (p. ej., proteínas de albúmina de fusión de la invención y fragmentos y variantes de la misma). Los sobrenadantes de las líneas celulares transfectadas con el vector vacío se utilizan como control negativo. La adición de 10 nM y/o 100 nM de insulina a los pocillos se utiliza como control positivo. Después de 48 horas de incubación, el medio condicionado se recoge y se mide la actividad de SEAP (protocolo Phospha-Light System, Tropix Núm. BP2500). En resumen, las muestras se diluyen 1:4 en tampón de dilución y se incuban a 65°C durante 30 minutos para inactivar la forma no placentaria endógena de SEAP. Una alícuota de 50 µl de las muestras diluidas se mezcla con 50 µl de Tampón de Análisis SEAP que contiene una mezcla de inhibidores activos contra las isoenzimas SEAP no placentarias y se incuba durante otros 5 minutos. Se añade a la mezcla una alícuota de 50 µl de sustrato quimioluminiscente CSPD

que se diluye 1:20 en potenciador de luminiscencia Emerald y se incuba durante 15-20 minutos. Las placas se leen en un luminómetro de placas Dynex.

Ejemplo 60: Animales transgénicos

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden expresar en animales transgénicos. Los animales de cualquier especie, incluyendo, pero no limitados a, ratones, ratas, conejos, hámsters, cobayas, cerdos, micro-cerdos, cabras, ovejas, vacas y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, monos y chimpancés pueden ser utilizados para generar animales transgénicos. En una realización específica, los mecanismos descritos en la presente memoria o conocidos de otra manera en la técnica, se utilizan para expresar las proteínas de fusión de la invención en seres humanos, como parte de un protocolo de terapia génica.

Se puede utilizar cualquier mecanismo conocido en la técnica para introducir los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de la albúmina de la invención en animales para producir las líneas fundadoras de animales transgénicos. Tales mecanismos incluyen, pero no se limitan a, microinyección pronuclear (Paterson et al., Appl Microbiol Biotechnol 40:691-698 (1994); Carver et al., Biotechnology (NY) 11: 1263-1270 (1993); Wright et al., Biotechnology (NY) 9: 830-834 (1991); y Hoppe et al., Patente de Estados Unidos Núm. 4.873.191 (1989)); transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (Van der Putten et al., Proc Natl Acad Sci, USA. 82: 6148-6152 (1985)), blastocistos o embriones; direccionamiento génico en células madre embrionarias (Thompson et al., Cell 56: 313-321 (1989)); electroporación de células o embriones (Lo, 1983, Mol Cell Biol 3: 1803-1814 (1983)); introducción de los polinucleótidos de la invención utilizando una pistola génica (véase, p. ej., Ulmer et al., Science 259: 1745 (1993); introducción de constructos de ácido nucleico en células madre pluripotentes embrionarias y transferencia de las células madre de nuevo a blastocistos; y transferencia de genes mediada por espermatozoides (Lavitrano y otros, Cell 57: 717-723 (1989); etc. Para una revisión de dichos mecanismos, véase Gordon, "Transgenic animals", Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229 (1989), que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Se puede utilizar cualquier mecanismo conocido en la técnica para producir clones transgénicos que contienen polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de la albúmina de la invención, por ejemplo, transferencia nuclear a oocitos enucleados de los núcleos de células embrionarias, fetales, o adultas cultivadas en las que se induce quiescencia (Campbell et al., Nature 380: 64-66 (1996); Wilmut et al., Nature 385: 810-813 (1997)).

La presente invención proporciona animales transgénicos que portan polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de la albúmina de la invención en todas sus células, así como animales que llevan estos polinucleótidos en algunas, pero no todas sus células, es decir, animales mosaico o quiméricos. El transgén se puede integrar como un único transgén o como múltiples copias, tales como en concatámeros, por ejemplo, tándems de cabeza a cabeza o tándems de cabeza a la cola. El transgén también se puede introducir selectivamente y activar en un tipo de célula concreto siguiendo, por ejemplo, la enseñanza de Lasko et al. (Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:6.232-6.236 (1992)). Las secuencias reguladoras requeridas para semejante activación específica del tipo de célula dependerán del tipo de célula particular de interés, y serán evidentes para los expertos en la técnica. Cuando se desea que el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención se integre en el sitio cromosómico del gen endógeno correspondiente a la porción de proteína terapéutica o una porción de la proteína de fusión de albúmina de la invención, se prefiere el direccionamiento de genes. En pocas palabras, cuando se va a utilizar dicha técnica, se diseñan los vectores que contienen algunas secuencias de nucleótidos homólogas al gen endógeno con el fin de integrar, mediante la recombinación homóloga con secuencias cromosómicas, e interrumpir la función de la secuencia de nucleótidos del gen endógeno. El transgén también se puede introducir selectivamente en un tipo celular concreto, inactivando de este modo el gen endógeno sólo en ese tipo de célula, siguiendo, por ejemplo, la enseñanza de Gu et al. (Gu et al., Science 265: 103-106 (1994)). Las secuencias reguladoras requeridas para semejante inactivación específica del tipo de célula dependerán del tipo de la célula concreta de interés, y serán evidentes para los expertos en la técnica.

Una vez que se han generado los animales transgénicos, la expresión del gen recombinante se puede analizar utilizando mecanismos convencionales. El escrutinio inicial se puede realizar mediante análisis por PCR o técnicas de transferencia Southern para analizar tejidos animales para verificar que la integración del polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención ha tenido lugar. El nivel de expresión de ARNm del polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención en los tejidos de los animales transgénicos también se puede evaluar utilizando mecanismos que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia Northern de muestras de tejido obtenidas del animal, análisis de hibridación *in situ*, y transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR). Las muestras de tejido que expresan la proteína de fusión también se pueden evaluar inmunocitoquímicamente o inmunohistoquímicamente utilizando anticuerpos específicos para la proteína de fusión.

Una vez que se producen los animales fundadores, éstos se pueden reproducir, someter a cruzamiento endogámico, someter a cruzamiento exogámico, o cruzar para producir colonias del animal concreto. Los ejemplos de tales estrategias de reproducción incluyen, pero no se limitan a: cruzamiento exogámico de animales fundadores con más de un sitio de integración con el fin de establecer líneas separadas; cruzamiento endogámico de líneas separadas con el fin de producir compuestos transgénicos que expresan el transgén a niveles más altos a causa de los efectos de la expresión aditiva de cada transgén; cruce de animales transgénicos heterocigotos para producir animales

homocigotos para un sitio de integración dado con el fin de aumentar la expresión y eliminar la necesidad de escrutinio de los animales mediante análisis de ADN; cruce de líneas homocigóticas separadas para producir líneas heterocigotas u homocigotas compuestas; y cría para colocar el transgén (es decir, el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de albúmina de la invención) en un fondo distinto que sea apropiado para un modelo experimental de interés. Los animales transgénicos de la invención tienen usos que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de modelos animales útiles en la elaboración de la función biológica de las proteínas de fusión de la invención y la proteína terapéutica y/o el componente de albúmina de la proteína de fusión de la invención, el estudio de las afecciones y/o trastornos asociados con la expresión aberrante, y el escrutinio de compuestos eficaces en la mejora de tales afecciones y/o trastornos.

10 **Ejemplo 61: Método de tratamiento utilizando la terapia génica ex-vivo**

Un método de terapia génica trasplanta fibroblastos, que son capaces de expresar una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, a un paciente. Generalmente, los fibroblastos se obtienen de un sujeto mediante biopsia de piel. El tejido resultante se coloca en un medio de cultivo de tejidos y se separa en pequeños trozos. Los pequeños trozos del tejido se colocan sobre una superficie húmeda de un matraz de cultivo de tejidos, se colocan aproximadamente diez piezas en cada matraz. El matraz se pone al revés, se cierra herméticamente y se deja a temperatura ambiente durante la noche. Después de 24 horas a temperatura ambiente, el matraz se invierte y los trozos de tejido permanecen fijos al fondo del matraz y se añade medio de nueva aportación (p. ej., medio F12 de Ham, con FBS al 10%, penicilina y estreptomina). Los matraces se incuban a continuación a 37 grados Celsius durante aproximadamente una semana.

20 En este momento, se añade medio de nueva aportación y posteriormente se cambia cada varios días. Después de dos semanas adicionales en cultivo, emerge una monocapa de fibroblastos. La monocapa se trata con tripsina y se aumenta a escala en matraces de mayor tamaño.

Se digiere pMV-7 (Kirschmeier, P.T. et al., DNA, 7: 219-25 (1988)), flanqueado por las repeticiones terminales largas del virus del sarcoma murino de Moloney con EcoRI y HindIII y posteriormente se trata con fosfatasa intestinal de ternera. El vector lineal se fracciona en gel de agarosa y se purifica, utilizando cuentas de vidrio.

Los polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden generar utilizando mecanismos conocidos en la técnica, amplificar utilizando cebadores de PCR que corresponden a las secuencias de los extremos 5' y 3' y, opcionalmente, tienen sitios de restricción apropiados y codones de iniciación/parada, si es necesario. Preferiblemente, el cebador 5' contiene un sitio EcoRI y el cebador 3' incluye un sitio HindIII. Se añaden cantidades iguales de la cadena principal del virus del sarcoma murino de Moloney lineal y el fragmento EcoRI y HindIII amplificado, en presencia de ADN ligasa de T4. La mezcla resultante se mantiene en condiciones apropiadas para la ligación de los dos fragmentos. La mezcla de ligación se utiliza a continuación para transformar bacterias HB101, que luego se cultivan en placa sobre agar que contiene kanamicina con el propósito de confirmar que el vector tiene el gen de interés adecuadamente insertado.

35 Las células de empaquetamiento pA317 o GP+am12 anfotrópicas se hacen crecer en cultivo de tejido hasta una densidad de confluencia en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con suero de ternera (CS) al 10%, penicilina y estreptomina. A continuación se añade al medio el vector MSV que contiene el gen y las células de empaquetamiento se transducen con el vector. Las células de empaquetamiento producen ahora partículas virales infecciosas que contienen el gen (las células de empaquetamiento se denominan ahora células productoras).

40 Se añade medio de nueva aportación a las células productoras transducidas, y posteriormente, se cosecha el medio de una placa de 10 cm de células productoras confluentes. El medio gastado, que contienen las partículas virales infecciosas, se filtra a través de un filtro Millipore para eliminar las células productoras desprendidas y este medio se utiliza después para infectar fibroblastos. Se retira el medio de una placa sub-confluyente de fibroblastos y rápidamente se reemplaza por el medio de las células productoras. Este medio se elimina y se reemplaza por medio de nueva aportación. Si el título de virus es alto, prácticamente todos los fibroblastos se infectarán y no se requerirá selección. Si el título es muy bajo, es necesario utilizar un vector retroviral que tenga un marcador seleccionable, tal como neo o his. Una vez que los fibroblastos se han infectado de manera eficiente, se analizan los fibroblastos para determinar si se produce la proteína de fusión de albúmina.

Los fibroblastos modificados son luego trasplantados al anfitrión, ya sea solos o después de haber sido cultivados hasta la confluencia sobre cuentas microportadoras Cytodex 3.

Ejemplo 62: Método de tratamiento utilizando terapia génica - in vivo

Otro aspecto de la presente invención consiste en utilizar los métodos de terapia génica *in vivo* para tratar trastornos, enfermedades y afecciones. El método de terapia génica se refiere a la introducción de secuencias de ácido nucleico desnudo (ADN, ARN, y ADN o ARN antisentido) que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención en un animal. Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden unir operativamente a (es decir, asociar con) un promotor u cualquier otro elemento genético necesario para la expresión del polipéptido por el tejido diana. Semejante terapia y mecanismos o métodos de suministro son conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, los documentos WO90/11092, WO98/11779; las Patentes de los

Estados Unidos Núms. 5693622, 5705151, 5580859; Tabata et al., *Cardiovasc. Res.* 35 (3): 470-479 (1997); Chao et al., *Pharmacol. Res.* 35 (6): 517-522 (1997); Wolff, *Neuromuscul. Disorders.* 7 (5): 314-318 (1997); Schwartz et al., *Gene Ther.* 3 (5): 405-411 (1996); Tsurumi et al., *Circulation* 94 (12): 3281-3290 (1996) (incorporados a la presente memoria como referencia).

- 5 Los constructos de polinucleótidos se pueden suministrar por cualquier método que proporcione materiales inyectables a las células de un animal, tal como, inyección en el espacio intersticial de los tejidos (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado, intestino y similares). Los constructos de polinucleótidos se pueden suministrar en un portador líquido o acuoso farmacéuticamente aceptable.

- 10 El término polinucleótido "desnudo", ADN o ARN, se refiere a secuencias que están libres de cualquier vehículo de administración que actúa para ayudar a promover o facilitar la entrada en la célula, incluyendo secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes precipitantes y similares. Sin embargo, los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención también se pueden suministrar en formulaciones de liposomas (tales como las que ilustran Feigner P.L. et al., (1995) *Ann NY Acad Sci* 772: 126-139 y Abdallah B. et al., (1995) *Cell Biol* 85(1): 1-7) que se pueden preparar mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

- 15 Los constructos vectores de polinucleótidos utilizados en el método de terapia génica son preferiblemente constructos que no se integrarán en el genoma del anfitrión ni contendrán secuencias que permitan la replicación. Cualquier promotor fuerte conocido por los expertos en la técnica se puede utilizar para conducir la expresión del ADN. A diferencia de otras técnicas de terapia génica, una ventaja principal de la introducción de secuencias de ácido nucleico desnudo en las células diana es la naturaleza transitoria de la síntesis de polinucleótidos en las células. Los estudios han demostrado que las secuencias de ADN no replicativas se pueden introducir en las células para proporcionar la producción del polipéptido deseado durante periodos de hasta seis meses.

- 20 El constructo de polinucleótido puede ser suministrado al espacio intersticial de los tejidos dentro de un animal, incluyendo músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículo, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándula, y tejido conectivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende el fluido intercelular, la matriz de mucopolisacárido entre las fibras reticulares de los tejidos de órganos, las fibras elásticas en las paredes de los vasos o cámaras, las fibras de colágeno de tejidos fibrosos o esa misma matriz dentro del tejido conectivo que envuelve las células musculares o en las lagunas de hueso. Es igualmente el espacio ocupado por el plasma de la circulación y el fluido linfático de los canales linfáticos. Se prefiere el suministro al espacio intersticial del tejido muscular por las razones expuestas a continuación. Se puede suministrar convenientemente mediante inyección en los tejidos que comprenden estas células. Se suministra preferiblemente a y se expresa en células persistentes, que no están en división que se diferencian, aunque el suministro y la expresión se pueden lograr en células no diferenciadas o menos completamente diferenciadas, tales como, por ejemplo, las células madre de la sangre o los fibroblastos de la piel. En las células musculares *in vivo* son particularmente competentes en su capacidad para captar y expresar polinucleótidos.

- 25 Para la inyección de polinucleótido desnudo, una cantidad de dosificación eficaz de ADN o ARN estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 g/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso. Preferiblemente, la dosis será de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg y más preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. Por supuesto, como apreciará el experto en la técnica, esta dosis variará de acuerdo con el sitio del tejido de la inyección. La dosificación apropiada y eficaz de la secuencia de ácido nucleico se puede determinar fácilmente por los expertos normales en la técnica y puede depender de la afección a tratar y de la vía de administración. La ruta preferida de administración es la inyección por vía parenteral en el espacio intersticial de los tejidos. Sin embargo, también se pueden utilizar otras vías parenterales, tales como, inhalación de una formulación en aerosol especialmente para la administración a los pulmones o tejidos bronquiales, garganta o membranas mucosas de la nariz. Además, los constructos de polinucleótidos desnudos se pueden suministrar a las arterias durante la angioplastia por el catéter utilizado en el procedimiento.

- 30 Los efectos de respuesta a la dosis de polinucleótido inyectado en el músculo *in vivo* se determinan de la siguiente manera. El ADN molde adecuado para la producción de ARNm que codifica el polipéptido de la presente invención se prepara de acuerdo con la metodología de ADN recombinante convencional. El ADN molde, que puede ser circular o lineal, se utiliza como ADN desnudo o formando complejo con liposomas. Se inyectan en músculos del cuádriceps de los ratones diversas cantidades del ADN molde.

- 35 Se anestesian ratones Balb/c hembra y macho de cinco a seis semanas de edad mediante inyección intraperitoneal con 0,3 mL de Avertin al 2,5%. Se realiza una incisión de 1,5 cm sobre la cara anterior del muslo, y se visualiza directamente el músculo cuádriceps. El ADN molde se inyecta en 0,1 mL de portador en una jeringa de 1 cc a través de una aguja de calibre 27 durante un minuto, aproximadamente a 0,5 cm del sitio de inserción distal del músculo dentro de la rodilla y a aproximadamente 0,2 cm de profundidad. Se realiza una sutura sobre el sitio de la inyección para la futura localización, y la piel se cierra con grapas de acero inoxidable.

Después de un tiempo de incubación apropiado (p. ej., 7 días) se preparan extractos musculares mediante la escisión de todo el cuádriceps. Una de cada cinco secciones transversales de 15 µm de los músculos del cuádriceps individuales se tiñe histoquímicamente para determinar la expresión de la proteína. Se puede realizar la secuencia temporal para la expresión de la proteína de fusión de una manera similar excepto que los cuádriceps de los diferentes ratones se cosechan en diferentes momentos. La persistencia de ADN en el músculo después de la inyección se puede determinar mediante análisis de transferencia Southern después de la preparación de ADN celular total y los sobrenadantes HIRT de los ratones que recibieron la inyección y de control. Los resultados de la experimentación anterior en los ratones se pueden utilizar para extrapolar dosis adecuadas y otros parámetros de tratamiento en seres humanos y otros animales utilizando ADN desnudo.

Ejemplo 63: Efectos biológicos de las proteínas de fusión de la invención

Análisis de astrocitos y neuronales

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden someter a ensayo para determinar la actividad de promoción de la supervivencia, el crecimiento de neuritas, o la diferenciación fenotípica de células neuronales corticales y para inducir la proliferación de las células inmunopositivas para la proteína ácida fibrilar glial, astrocitos. La selección de células corticales para el bioanálisis se basa en la expresión predominante de FGF-1 y FGF-2 en las estructuras corticales y en la potenciación previamente referida de la supervivencia neuronal cortical que resulta del tratamiento con FGF-2. Se puede utilizar un análisis de incorporación de timidina, por ejemplo, para dilucidar la actividad de una proteína de fusión de albúmina de la invención sobre estas células.

Por otra parte, los informes anteriores que describen los efectos biológicos de FGF-2 (FGF básico) sobre las neuronas corticales o del hipocampo in vitro han demostrado aumentos en el análisis tanto de la supervivencia neuronal como del crecimiento de neuritas (Walicke et al., "Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension" Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 3012- 3016 (1986), incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad). Sin embargo, los informes de experimentos hechos en células PC- 12 sugieren que estas dos respuestas no son necesariamente sinónimas y pueden depender no sólo de qué FGF se esté sometiendo a ensayo, sino también de qué receptor o receptores se expresen en las células diana. Utilizando el paradigma de cultivo neuronal cortical primario, se puede comparar la capacidad de una proteína de fusión de albúmina de la invención para inducir el crecimiento de neuritas con la respuesta conseguida con FGF-2 utilizando, por ejemplo, un análisis de incorporación de timidina.

Análisis de fibroblastos y células endoteliales

Se obtienen fibroblastos de pulmón humano de Clonetics (San Diego, CA) y se mantienen en medio de crecimiento de Clonetics. Las células endoteliales microvasculares dérmicas se obtienen de Cell Applications (San Diego, CA). Para los análisis de proliferación, los fibroblastos de pulmón humano y las células endoteliales microvasculares dérmicas pueden ser cultivados a 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un día en medio de crecimiento. Las células se incuban a continuación durante un día en medio basal de BSA al 0,1%. Después de sustituir el medio por medio de BSA al 0,1% de nueva aportación, las células se incuban con la proteína de fusión de ensayo de la invención durante 3 días. Se añade Azul Alamar (Alamar Biosciences, Sacramento, CA) a cada pocillo a una concentración final de 10%. Las células se incuban durante 4 hr. La viabilidad celular se mide mediante la lectura en un lector de fluorescencia CytoFluor. Para los análisis de PGE₂, los fibroblastos de pulmón humano se cultivan a 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un día. Después de cambiar el medio a medio basal de BSA al 0,1%, las células se incuban con FGF-2 o proteína de fusión de la invención con o sin IL-1α durante 24 horas. Se recoge el sobrenadante y se analiza para determinar la PGE₂ mediante un kit de EIA (Cayman, Ann Arbor, MI). Para los análisis de IL-6, los fibroblastos de pulmón humano se cultivan a 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un día. Después de un cambio de medio a medio basal de BSA al 0,1%, las células se incuban con FGF-2 o con o sin una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o IL-1α durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogen y se analizan para determinar la IL-6 mediante un kit de ELISA (Endogen, Cambridge, MA).

Se cultivan fibroblastos de pulmón humano con FGF-2 o una proteína de fusión de albúmina de la invención durante 3 días en medio basal antes de la adición de Azul Alamar para evaluar los efectos sobre el crecimiento de los fibroblastos. El FGF-2 debe mostrar una estimulación a 10 - 2500 ng/mL que se puede utilizar para comparar la estimulación con la proteína de fusión de la invención.

Proliferación celular basada en la incorporación de [3H]timidina

El siguiente análisis de incorporación de [3H]timidina se puede utilizar para medir el efecto de una proteína Terapéutica, por ejemplo, las proteínas del factor de crecimiento, sobre la proliferación de células tales como fibroblastos, células epiteliales o células musculares inmaduras.

Se detienen cultivos subconfluentes en la fase G1 mediante una incubación durante 18 h en medio libre de suero. Después se añaden las proteínas terapéuticas durante 24 h y durante las últimas 4 h, los cultivos se marcan con [3H]timidina, a una concentración final de 0,33 µM (25 Ci/mmol, Amersham, Arlington Heights, IL). La [3H]timidina incorporada se hace precipitar con ácido tricloroacético al 10% enfriado con hielo durante 24 h. Con posterioridad,

las células se enjuagan secuencialmente con ácido tricloroacético al 10% enfriado con hielo y después con agua enfriada con hielo. Después de la lisis en NaOH 0,5 M, los productos lisados y los productos enjuagados con PBS (500 ml) se combinan, y se mide la cantidad de radiactividad.

Modelos de Parkinson

5 La pérdida de la función motora en la enfermedad de Parkinson se atribuye a una deficiencia de dopamina estriatal que resulta de la degeneración de las neuronas de proyección dopaminérgica nigroestriatal. Un modelo animal para el Parkinson que se ha caracterizado extensamente implica la administración sistémica de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). En el SNC, la MPTP es absorbida por los astrocitos y catabolizada por la monoamina oxidasa B a 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) y liberada. Posteriormente, la MPP⁺ se acumula activamente en las neuronas dopaminérgicas por el transportador de reabsorción de alta afinidad para dopamina. La MPP⁺ se concentra a continuación en las mitocondrias por el gradiente electroquímico e inhibe selectivamente el difosfato de nicotidamida y adenina: ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), interfiriendo de este modo en el transporte de electrones y, finalmente, generando radicales de oxígeno.

15 Se ha demostrado en paradigmas de cultivos de tejidos que el FGF-2 (FGF básico) tiene actividad trófica hacia las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Ferrari et al., Dev. Biol. 1989). Recientemente, el grupo del Dr. Unsicker ha demostrado que la administración de FGF-2 en implantes de Gelfoam en el cuerpo estriado dan como resultado la protección casi completa de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de la toxicidad asociada con la exposición a MPTP (Otto y Unsicker, J. Neuroscience, 1990).

20 Basándose en los datos con FGF-2, se puede evaluar una proteína de fusión de albúmina de la invención para determinar si tiene una acción similar a la de FGF-2 en la mejora de la supervivencia neuronal dopaminérgica *in vitro* y también se puede someter a ensayo *in vivo* para determinar la protección de las neuronas dopaminérgicas en el cuerpo estriado frente a los daños asociados con el tratamiento con MPTP. El efecto potencial de una proteína de fusión de albúmina de la invención se examina primero *in vitro* en un paradigma de cultivo de células neuronales dopaminérgicas. Los cultivos se preparan mediante la disección de la placa del piso del mesencéfalo a partir del día 14 de gestación de embriones de ratas Wistar. El tejido se disocia con tripsina y se siembra a una densidad de 200.000 células/cm² sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con poliornitina-laminina. Las células se mantienen en medio de Eagle Modificado de Dulbecco y medio F12 que contiene suplementos hormonales (NI). Los cultivos se fijan con paraformaldehído al cabo de 8 días *in vitro* y se procesan para determinar la tirosina hidroxilasa, un marcador específico para las neuronas dopaminérgicas, tinción inmunohistoquímica. Los cultivos de células disociadas se preparan a partir de ratas embrionarias. El medio de cultivo se cambia cada tres días y en ese momento también se añaden los factores.

30 Puesto que las neuronas dopaminérgicas se aíslan de animales en el día de gestación 14, un momento del desarrollo en el que se ha pasado la fase en la que las células precursoras dopaminérgicas están proliferando, un aumento en el número de neuronas inmunopositivas para tirosina hidroxilasa representaría un aumento en el número de neuronas dopaminérgicas que sobreviven *in vitro*. Por lo tanto, si una proteína terapéutica de la invención actúa prolongando la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, esto sugeriría que la proteína de fusión podría estar implicada en la enfermedad de Parkinson.

Ejemplo 64: Terapia combinada con trasplante de células beta-pancreáticas

40 El trasplante es una forma común de tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria, especialmente cuando el propio tejido diana ha sido severamente dañado. Por ejemplo, y no a modo de limitación, trasplante de páncreas y el trasplante de células de los islotes son las opciones de tratamiento comunes para la DMID (Véase, p. ej., Stewart et al., Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86 (3): 984-988 (2001); Brunicaudi, Transplant. Proc. 28: 2138-40 (1996); Kendall & Robertson, Diabetes Metab. 22: 157-163 (1996); Hamano et al., Kobe J. Med Sci. 42: 93-104 (1996); Larsen & Stratta, Diabetes Metab. 22: 139-146 (1996); y Kinkhabwala, et al., Am J. Surg 171: 516-520 (1996)). Al igual que con cualquier método de trasplante, las terapias de trasplante para los pacientes de enfermedades autoinmunitarias incluyen tratamientos para reducir al mínimo el riesgo de rechazo del anfitrión al tejido trasplantado. Sin embargo, la enfermedad autoinmunitaria implica el riesgo adicional, independiente de que la respuesta autoinmunitaria del anfitrión pre-existente que dañó el propio tejido original ejerza el mismo efecto perjudicial sobre el tejido trasplantado. En consecuencia, la presente invención abarca métodos y composiciones para el tratamiento de la enfermedad pancreática autoinmunitaria utilizando las proteínas de fusión de albúmina de la invención sujeto combinadas con inmunomoduladores/inmunosupresores en individuos sometidos a la terapia de trasplante de la enfermedad autoinmunitaria.

55 De acuerdo con la invención, las composiciones y formulaciones basadas en la fusión con albúmina descritas anteriormente, se administran para prevenir y tratar el daño a los órganos, tejidos o células trasplantados resultante de la respuesta autoinmunitaria del individuo anfitrión dirigida inicialmente contra el propio tejido original. La administración se puede llevar a cabo tanto antes como después del trasplante en 2 a 4 dosis con una semana de diferencia.

Los siguientes inmunomoduladores/inmunosupresores, incluyendo, pero no limitados a, AI-401, CDP-571

(anticuerpo monoclonal anti-TNF), CG-1088, Diamyd (vacuna contra la diabetes), ICM3 (anticuerpo monoclonal anti-ICAM-3), linomida (Roquinimex), NBI-6024 (ligando peptídico alterado), TM-27, VX-740 (HMR-3480), inhibidores de la proteasa caspasa 8, talidomida, hOKT3gamma1 (Ala- ala) (anticuerpo monoclonal anti-CD3), Interferón-alfa oral, lactobacillus oral, y LymphoStat-B™ se pueden utilizar junto con los agentes terapéuticos de fusión de albúmina de la presente invención en el trasplante de células de los islotes o páncreas.

Ejemplo 65: Identificación y clonación de dominios VH y VL

Un método para identificar y clonar los dominios VH y VL dominios de líneas celulares que expresan un anticuerpo concreto consiste en llevar a cabo una PCR con cebadores específicos de VH y VL sobre ADNc elaborado a partir de líneas celulares que expresan el anticuerpo. Brevemente, el ARN se aísla de las líneas celulares y se utiliza como molde para la RT-PCR diseñada para amplificar los dominios VH y VL de los anticuerpos expresados por las líneas celulares de EBV. Las células se pueden lisar en el reactivo TRIzol® (Life Technologies, Rockville, MD) y extraer con un quinto de volumen de cloroformo. Después de la adición de cloroformo, la solución se incuba a la temperatura ambiente durante 10 minutos, y se centrifuga a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga de mesa. El sobrenadante se recoge y el ARN se precipita utilizando un volumen igual de isopropanol. El ARN precipitado se sedimenta por centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga de mesa. Después de la centrifugación, el sobrenadante se descarta y se lava con etanol del 75%. Después del lavado, el ARN se centrifuga de nuevo a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se desecha y el sedimento se deja secar al aire. El ARN se disuelve en agua DEPC y se calienta a 60°C durante 10 minutos. Las cantidades de ARN se pueden determinar utilizando medidas de densidad óptica.

El ADNc se puede sintetizar, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, a partir de 1,5-2,5 microgramos de ARN utilizando transcriptasa inversa y cebadores hexaméricos aleatorios. El ADNc se utiliza a continuación como molde para la amplificación mediante PCR de los dominios VH y VL. Los cebadores utilizados para amplificar los genes VH y VL se muestran en la Tabla 7. Típicamente una reacción de PCR hace uso de un único cebador 5' y un único cebador 3'. Algunas veces, cuando la cantidad de molde de ARN disponible es limitante, o para una mayor eficiencia, se pueden utilizar grupos de cebadores 5' y/o 3'. Por ejemplo, algunas veces los cinco cebadores VH-5' y todos los cebadores JH-3' se usan en una sola reacción de PCR. La reacción de PCR se lleva a cabo en un volumen de 50 microlitros que contiene tampón de 1X tampón de PCR, 2 mM de cada dNTP, 0,7 unidades polimerasa Taq de alta fidelidad, mezcla de cebadores 5', mezcla de cebadores 3' y 7,5 microlitros de ADNc. La mezcla de cebadores 5' y 3' de VH y VL se puede elaborar reuniendo 22 pmoles y 28 pmoles, respectivamente, de cada uno de los cebadores individuales. Las condiciones de la PCR son: 96°C durante 5 minutos; seguido por 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; seguido de un ciclo de extensión de 72°C durante 10 minutos. Después de completar la reacción, los tubos de muestra se almacenan 4°C.

Tabla 7: Secuencias de cebadores utilizados para amplificar los dominios VH y VL

Nombre del Cebador	SEQ ID NO	Secuencia del Cebador (5'-3')
<i>Cebadores VH</i>		
Hu VH1-5'	62	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
Hu VH2-5'	63	CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG
Hu VH3-5'	64	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
Hu VH4-5'	65	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
Hu VH5-5'	66	GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC
Hu VH6-5'	67	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
Hu JH1,2-5'	68	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
Hu JH3-5'	69	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC
Hu JH4,5-5'	70	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
Hu JH6-5'	71	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC

Nombre del Cebador	SEQ ID NO	Secuencia del Cebador (5'-3')
<i>Cebadores VL</i>		
Hu Vkappa1-5'	72	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
Hu Vkappa2a-5'	73	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
Hu Vkappa2b-5'	74	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC
Hu Vkappa3-5'	75	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC
Hu Vkappa4-5'	76	GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
Hu Vkappa5-5'	77	GAAACGACACTCACGCAGTCTCC
Hu Vkappa6-5'	78	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
Hu Vlambda1-5'	79	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Hu Vlambda2-5'	80	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Hu Vlambda3-5'	81	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Hu Vlambda3b-5'	82	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Hu Vlambda4-5'	83	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Hu Vlambda5-5'	84	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Hu Vlambda6-5'	85	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA
Hu Jkappa1-3'	86	ACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC
Hu Jkappa2-3'	87	ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
Hu Jkappa3-3'	88	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC
Hu Jkappa4-3'	89	ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC
Hu Jkappa5-3'	90	ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
Hu Jlambda1-3'	91	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Hu Jlambda2-3'	92	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Hu Jlambda3-3'	93	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Hu Jlambda3b-3'	94	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Hu Jlambda4-3'	95	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Hu Jlambda5-3'	96	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC

Nombre del Cebador	SEQ ID NO	Secuencia del Cebador (5'-3')
Hu Jlambda6-3'	97	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA

Las muestras de PCR se someten a continuación a electroforesis en un gel de agarosa al 1,3%. Las bandas de ADN de los tamaños esperados (~506 pares de bases para dominios los VH, y 344 pares de bases para los dominios VL) se pueden cortar del gel y se purifican utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Los productos de la PCR purificados se pueden ligar en un vector de clonación de PCR (Vector TA de Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). Los productos de la PCR clonados individuales se pueden aislar después de la transfección de *E. coli* y la selección de color azul/blanco. Los productos de la PCR clonados se secuencian a continuación utilizando métodos comúnmente conocidos en la técnica.

Las bandas de PCR que contienen el dominio VH y los dominios VL también se pueden utilizar para crear vectores de expresión de Ig de larga duración. Los dominios VH y VL se pueden clonar en vectores que contienen las secuencias de nucleótidos de regiones constantes de una cadena pesada (p. ej., IgG1 humana o IgG4 humana) o ligera (kappa humana o lambda humana) de tal manera que se pueda expresar una molécula de cadena pesada o ligera completa a partir de estos vectores cuando se transfectan a una célula anfitriona apropiada. Además, cuando las cadenas pesada y ligera clonadas se expresan ambas en una línea celular (a partir de uno o dos vectores), se pueden ensamblar en una molécula de anticuerpo funcional completa que se secreta al medio de cultivo celular. Los métodos que utilizan los polinucleótidos que codifican los dominios de anticuerpo VH y VL para generar vectores de expresión que codifican moléculas de anticuerpo completas son bien conocidos en la técnica.

Ejemplo 66: Preparación de proteínas de fusión de HA-citoquina o HA-factor de crecimiento (tales como NGF, BDNF, BDNFb y BDNF)

El ADNc para la citoquina o el factor de crecimiento de interés, tal como NGF, se puede aislar por una variedad de medios, incluyendo bibliotecas de ADNc, RT-PCR o PCR utilizando una serie de cebadores oligonucleotídicos sintéticos solapantes, todos utilizando métodos convencionales. Las secuencias de nucleótidos para todas estas proteínas son conocidas y se encuentran disponibles. El ADNc se puede adaptar a los extremos 5' y 3' para generar sitios de restricción, de modo que los conectores de oligonucleótidos se pueden utilizar para la clonación del ADNc en un vector que contiene el ADNc para HA. Esto puede ser en el extremo N o C, con o sin el uso de una secuencia espaciadora. El ADNc de NGF (u otra citoquina) se clona en un vector tal como pPPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA a partir del cual se escinde a continuación el casete de expresión completo y se inserta en el plásmido pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en levadura. La proteína de fusión de albúmina secretada de la levadura se puede recoger y purificar a continuación del medio y someter a ensayo para determinar su actividad biológica. Para la expresión en líneas celulares de mamífero, se adopta un procedimiento similar excepto que el casete de expresión utilizado emplea un promotor, una secuencia líder y un terminador de mamífero (Véase el Ejemplo 1). Este casete de expresión se escinde a continuación, y se inserta en un plásmido adecuado para la transfección de líneas celulares de mamífero.

Ejemplo 67: Preparación de proteínas de fusión de HA-IFN (tal como IFN α)

El ADNc para el interferón de interés, tal como IFN α se pueden aislar por una variedad de medios que incluyen, pero no exclusivamente, bibliotecas de ADNc, RT-PCR o PCR utilizando una serie de cebadores oligonucleotídicos sintéticos solapantes, todos utilizando métodos convencionales. Se conocen las secuencias de nucleótidos para los interferones, tales como IFN α y se encuentran disponibles, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos 5.326.859 y 4.588.585, en el documento EP 32 134, así como en bases de datos públicas tales como GenBank. El ADNc se puede adaptar a los extremos 5' y 3' para generar sitios de restricción, de modo que los conectores de oligonucleótidos se pueden utilizar para clonar el ADNc en un vector que contiene el ADNc para HA. Esto puede ser en el extremo N o C de la secuencia de HA, con o sin el uso de una secuencia espaciadora. El ADNc de IFN α (u otro interferón) se clona en un vector tal como pPPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA a partir del cual se escinde a continuación el casete de expresión completo y se inserta en el plásmido pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en la levadura. La proteína de fusión de albúmina secretada de la levadura se puede recoger y purificar después del medio y someter a ensayo para determinar su actividad biológica. Para la expresión en líneas celulares de mamífero se adopta un procedimiento similar, excepto que el casete de expresión utilizado emplea un promotor, una secuencia líder y un terminador de mamífero (Véase el Ejemplo 1). Este casete de expresión se escinde a continuación, y se inserta en un plásmido adecuado para la transfección de líneas celulares de mamífero.

Recuperación máxima de proteína de los viales

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención tienen un alto grado de estabilidad incluso cuando se empaquetan a concentraciones bajas. Además, a pesar de la baja concentración de proteína, se observa una buena recuperación de proteína de fusión, incluso cuando la solución acuosa no incluye ninguna otra proteína añadida para

minimizar la unión a las paredes del vial. La recuperación de las soluciones de HA-IFN almacenadas en los viales se comparó con una solución de partida. Se colocaron soluciones de 6 o 30 µg/mL de HA-IFN en viales y se almacenaron a 4°C. Después de 48 ó 72 horas se retiró un volumen inicialmente equivalente a 10 ng de muestra y se midió en un ELISA sándwich para IFN. Los valores estimados se compararon con los de una solución de partida de alta concentración. Como se muestra, no hay esencialmente pérdida de la muestra en estos viales, lo que indica que la adición de un material exógeno tal como la albúmina no es necesaria para evitar la pérdida de muestra en la pared de los viales.

Estabilidad in vivo y biodisponibilidad de las fusiones de HA-IFNα

Para determinar la estabilidad in vivo y la biodisponibilidad de una molécula de fusión de HA-IFNα, se administró la molécula de fusión purificada (a partir de levadura) a monos. Las composiciones farmacéuticas formuladas a partir de fusiones de HA-IFNα pueden explicar la vida media prolongada en suero y la biodisponibilidad. De acuerdo con ello, se pueden formular composiciones farmacéuticas para que contengan dosis más bajas de actividad interferón-alfa en comparación con la molécula de interferón alfa nativa.

Las composiciones farmacéuticas que contienen fusiones de HA-IFNα se pueden utilizar para tratar o prevenir la enfermedad en pacientes con cualquier enfermedad o estado de enfermedad que puedan ser modulados por la administración de IFNα. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, verrugas genitales y anales, hepatitis B crónica, hepatitis no A crónica, hepatitis no B, en particular la hepatitis C, hepatitis D, leucemia mielógena crónica, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga, carcinoma de ovario y de cuello uterino, cáncer de piel, papilomatosis respiratoria recurrente, linfomas no Hodgkin y de células T cutáneos, melanoma, mieloma múltiple, SIDA, esclerosis múltiple, glioblastoma, etc. (véase Interferon Alpha, en: AHFS Drug Information, 1997).

Por consiguiente, la invención incluye composiciones farmacéuticas que contienen una proteína, polipéptido o péptido de fusión de HA-IFNα formuladas con la dosis adecuada para la administración a seres humanos. La invención incluye también métodos de tratamiento de pacientes que necesitan semejante tratamiento que comprenden al menos la etapa de administrar una composición farmacéutica que contiene al menos una proteína, polipéptido o péptido de fusión de HA-α-IFN.

Fusiones de HA-IFNα difuncionales

Un vector de expresión de HA-IFNα se puede modificar para que incluya una inserción para la expresión de proteínas de fusión de HA-IFNα bifuncionales. Por ejemplo, se puede insertar el ADNc para una segunda proteína de interés en marco aguas abajo de la secuencia de "rHA-IFN" después de haber eliminado o desplazado aguas abajo el doble codón de parada de la secuencia codificante.

En una versión de una proteína de fusión de HA-IFNα, se puede fusionar un anticuerpo o fragmento contra la proteína estimuladora de linfocitos B (GenBank Acc. 4455139) o se puede fusionar el polipéptido a un extremo del componente HA de la molécula de fusión. Esta proteína bifuncional es útil para la modulación de cualquier respuesta inmunitaria generada por el componente IFNα de la fusión.

Ejemplo 68: Preparación de proteína de fusión de HA-hormona

El ADNc para la hormona de interés se puede aislar mediante una variedad de medios que incluyen, pero no exclusivamente, bibliotecas de ADNc, RT-PCR o PCR utilizando una serie de cebadores de oligonucleótidos sintéticos solapantes, todos utilizando métodos convencionales. Las secuencias de nucleótidos para todas estas proteínas son conocidas y se encuentran disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas tales como GenBank. El ADNc se puede adaptar a los extremos 5' y 3' para generar sitios de restricción, de modo que se pueden utilizar conectores de oligonucleótidos para la clonación del ADNc en un vector que contiene el ADNc para HA. Esto puede ser en el extremo N o C, con o sin el uso de una secuencia espaciadora. El ADNc de la hormona se clona en un vector tal como PPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA a partir del cual se escinde a continuación el casete de expresión completo y se inserta en el plásmido pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en la levadura. La proteína de fusión de albúmina secretada de la levadura se puede recoger y purificar del medio y someter a ensayo para determinar su actividad biológica. Para la expresión en líneas celulares de mamífero se adopta un procedimiento similar excepto que el casete de expresión utilizado emplea un promotor, una secuencia líder y un terminador de mamífero (Véase el Ejemplo 1). Este casete de expresión se escinde a continuación, y se inserta en un plásmido adecuado para la transfección de líneas celulares de mamífero.

Ejemplo 69: Preparación de proteína de fusión de HA- receptor soluble o HA-proteína de fusión

El ADNc para el receptor soluble o la proteína de unión de interés se puede aislar mediante una variedad de medios que incluyen, pero no exclusivamente, bibliotecas de ADNc, RT-PCR y PCR utilizando una serie de cebadores de oligonucleótidos sintéticos solapantes, todos utilizando métodos convencionales. Las secuencias de nucleótidos para todas estas proteínas son conocidas y se encuentran disponibles, por ejemplo, en GenBank. El ADNc se puede adaptar a los extremos 5' y 3' para generar sitios de restricción, de modo que se pueden utilizar conectores de oligonucleótidos para la clonación del ADNc en un vector que contiene el ADNc para HA. Esto puede ser en el

extremo N o C, con o sin el uso de una secuencia espaciadora. El ADNc del receptor se clona en un vector tal como pPPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA a partir del cual se escinde a continuación el casete de expresión completo y se inserta en el plásmido pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en la levadura. La proteína de fusión de albúmina secretada de la levadura se puede recoger y purificar a partir del medio y someter a ensayo para determinar su actividad biológica. Para la expresión en líneas celulares de mamífero se adopta un procedimiento similar excepto que el casete de expresión utilizado emplea un promotor, una secuencia líder y un terminador de mamífero (Véase el Ejemplo 1). Este casete de expresión se escinde a continuación, y se inserta en un plásmido adecuado para la transfección de líneas celulares de mamífero.

Ejemplo 70: Preparación HA-factores de crecimiento

El ADNc para el factor de crecimiento de interés se puede aislar mediante una variedad de medios que incluyen, pero no exclusivamente, bibliotecas de ADNc, RT-PCR y PCR utilizando una serie de cebadores de oligonucleótidos sintéticos solapantes, todos utilizando los métodos convencionales (véase Núm. Acc. de GenBank NP_000609). El ADNc se puede adaptar a los extremos 5' y 3' para generar sitios de restricción, de modo que se pueden utilizar los conectores de oligonucleótidos para la clonación del ADNc en un vector que contiene el ADNc para HA. Esto puede ser en el extremo N o C, con o sin el uso de una secuencia espaciadora. El ADNc del factor de crecimiento se clona en un vector tal como pPPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA a partir del cual se escinde a continuación el casete de expresión completo y se inserta en el plásmido pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en levadura. La proteína de fusión de albúmina secretada de la levadura se puede recoger y purificar del medio y someter a ensayo para determinar su actividad biológica. Para la expresión en líneas celulares de mamífero se adopta un procedimiento similar excepto que el casete de expresión utilizado emplea un promotor, una secuencia líder y un terminador de mamífero (Véase el Ejemplo 1). Este casete de expresión se escinde a continuación, y se inserta en un plásmido adecuado para la transfección de líneas celulares de mamífero.

Ejemplo 71: Preparación de proteínas de fusión de HA-anticuerpo de cadena sencilla

Los anticuerpos de cadena sencilla son producidos por varios métodos, incluyendo pero no limitados a: selección de bibliotecas de fagos, mediante clonación de la región variable de un anticuerpo específico por clonación del ADNc del anticuerpo y utilización de las regiones constantes flanqueantes como cebador para clonar la región variable, o mediante síntesis de un oligonucleótido que corresponde a la región variable de cualquier anticuerpo específico. El ADNc se puede adaptar a los extremos 5' y 3' para generar sitios de restricción, de modo que se pueden utilizar conectores de oligonucleótidos, para la clonación del ADNc en un vector que contiene el ADNc para HA. Esto puede ser en el extremo N o C, con o sin el uso de una secuencia espaciadora. El ADNc de las células se clona en un vector tal como pPPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA a partir del cual se escinde a continuación el casete de expresión completo y se inserta en el plásmido pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en la levadura.

En las moléculas de fusión de la invención, V_H y V_L pueden estar unidos por uno de los siguientes medios o una combinación de los mismos: un conector peptídico entre el extremo C de V_H y el extremo N de V_L ; un sitio de escisión de la proteasa Kex2p entre V_H y V_L de tal manera que los dos se escinden después de la secreción y luego se auto-asocian; y residuos de cistina posicionados de tal manera que V_H y V_L pueden formar un enlace disulfuro entre ellos para unirlos. Una opción alternativa sería colocar V_H en el extremo N de HA o un fragmento del dominio de HA y V_L en el extremo C HA o un fragmento del dominio de HA.

La proteína de fusión de albúmina secretada de la levadura se puede recoger y purificar a continuación del medio y someter a ensayo su actividad. Para la expresión en líneas celulares de mamífero se adopta un procedimiento similar excepto que el casete de expresión utilizado emplea un promotor, una secuencia líder y un terminador de mamífero (Véase el Ejemplo 1). Este casete de expresión se escinde a continuación, y se inserta en un plásmido adecuado para la transfección de líneas celulares de mamífero. El anticuerpo producido de esta manera se puede purificar del medio y someter a ensayo la unión a su antígeno utilizando procedimientos inmunológicos convencionales.

Ejemplo 72: Preparación de proteínas de fusión de HA-moléculas de adherencia celular

El ADNc para la molécula de adherencia celular de interés se puede aislar mediante una variedad de medios que incluyen, pero no exclusivamente, bibliotecas de ADNc, RT-PCR y PCR utilizando una serie de cebadores de oligonucleótidos sintéticos solapantes, todos utilizando métodos convencionales. Las secuencias de nucleótidos de las moléculas de adherencia celular conocidas son conocidas y se encuentran disponibles, por ejemplo, en GenBank. El ADNc se puede adaptar a los extremos 5' y 3' para generar sitios de restricción, de modo que se pueden utilizar conectores de oligonucleótidos, para la clonación del ADNc en un vector que contiene el ADNc para HA. Esto puede ser en el extremo N o C, con o sin el uso de una secuencia espaciadora. El ADNc de la molécula de adherencia celular se clona en un vector tal como pPPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA a partir del cual se escinde a continuación el casete de expresión completo y se inserta en el plásmido pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en levadura. La proteína de fusión de albúmina secretada de la levadura se puede recoger y purificar del medio y someter a ensayo para determinar su actividad biológica. Para la expresión en líneas celulares de mamífero se adopta un procedimiento similar excepto que el casete de expresión

utilizado emplea un promotor, una secuencia líder y un terminador de mamífero (Véase el Ejemplo 1). Este casete de expresión se escinde a continuación, y se inserta en un plásmido adecuado para la transfección de líneas celulares de mamífero.

Ejemplo 73: Preparación de factores inhibidores y péptidos como proteínas de fusión de HA (tales como HA-antiviral, HA-antibiótico, HA-inhibidor enzimático y HA- anti-proteínas alérgicas)

El ADNc para el péptido de interés, tal como un péptido antibiótico se puede aislar por una variedad de medios que incluyen, pero no exclusivamente, bibliotecas de ADNc, RT-PCR y PCR utilizando una serie de cebadores de oligonucleótidos sintéticos solapantes, todos utilizando métodos convencionales. El ADNc se puede adaptar a los extremos 5' y 3' para generar sitios de restricción, de modo que se pueden utilizar conectores de oligonucleótidos, para la clonación del ADNc en un vector que contiene el ADNc para HA. Esto puede ser en el extremo N o C, con o sin el uso de una secuencia espaciadora. El ADNc del péptido se clona en un vector tal como pPPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA a partir del cual se escinde a continuación el casete de expresión completo y se inserta en el plásmido pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en la levadura. La proteína de fusión de albúmina secretada de la levadura se puede recoger y purificar del medio y someter a ensayo para determinar su actividad biológica. Para la expresión en líneas celulares de mamífero se adopta un procedimiento similar excepto que el casete de expresión utilizado emplea un promotor, una secuencia líder y un terminador de mamífero (Véase el Ejemplo 1). Este casete de expresión se escinde a continuación, y se inserta en un plásmido adecuado para la transfección de líneas celulares de mamífero.

Ejemplo 74: Preparación de proteínas de fusión de HA específicas.

El ADNc para la proteína de interés se puede aislar de la biblioteca de ADNc o se puede elaborar sintéticamente utilizando varios oligonucleótidos solapantes empleando métodos convencionales de la biología molecular. Los nucleótidos adecuados pueden ser modificados en el ADNc para formar sitios de restricción convenientes y también permitir el anclaje del ADNc de la proteína al ADNc de albúmina. También se puede fusionar un ADNc de una proteína o péptido de direccionamiento tal como anticuerpo de cadena sencilla o péptido, tales como señales de localización nuclear, que pueden dirigir las proteínas al interior de las células con el otro extremo de la albúmina. La proteína de interés y el péptido de direccionamiento se clonan en un vector tal como pPPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA para permitir la fusión con el ADNc de albúmina. De esta manera ambos extremos N y C de la albúmina se fusionan con otras proteínas. El ADNc fusionado se escinde luego de pPPC0005 y se inserta en un plásmido tal como pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en la levadura. Todos los procedimientos anteriores se pueden realizar utilizando métodos convencionales de la biología molecular. La proteína de fusión de albúmina secretada a partir de levadura se puede recoger y purificar del medio y someter a ensayo para determinar su actividad biológica y su actividad de direccionamiento mediante ensayos bioquímicos y biológicos apropiados.

Ejemplo 75: Preparación de fusiones de HA-enzima

El ADNc para la enzima de interés se puede aislar mediante una variedad de medios que incluyen, pero no exclusivamente, bibliotecas de ADNc, RT-PCR y PCR utilizando una serie de cebadores de oligonucleótidos sintéticos solapantes, todos utilizando métodos convencionales. El ADNc se puede adaptar a los extremos 5' y 3' para generar sitios de restricción, de modo que se pueden utilizar conectores de oligonucleótidos, para la clonación del ADNc en un vector que contiene el ADNc para HA. Esto puede ser en el extremo N o C con o sin el uso de una secuencia espaciadora. El ADNc de la enzima se clona en un vector tal como pPPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA a partir del cual se escinde continuación el casete de expresión completo y se inserta en el plásmido pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en la levadura. La proteína de fusión de albúmina secretada de la levadura se puede recoger y purificar después del medio y someter a ensayo para determinar su actividad biológica. Para la expresión en líneas celulares de mamífero se adopta un procedimiento similar excepto que el casete de expresión utilizado emplea un promotor, una secuencia líder y un terminador de mamífero (Véase el Ejemplo 1). Este casete de expresión se escinde a continuación, y se inserta en un plásmido adecuado para la transfección de líneas celulares de mamífero.

Ejemplo 76: Constructo ID 2053. IFNb-HSA. Generación.

El ID de constructo 2053, pEE12.1:1FNb.HSA, comprende ADN que codifica una proteína de fusión de IFNb y albúmina que tiene la proteína IFNb completa incluyendo la secuencia líder de IFNb nativo fusionada al extremo amino de la forma madura de HSA en el vector de expresión NS0 pEE 12.1.

Clonación de ADNc de IFNb

El polinucleótido que codificaba IFNb se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores IFNb-1 e IFNb-2, descritos a continuación, se cortó con *Bam* HI/*Cla* I, y se ligó en pC4:HSA cortada con *Bam* HI/*Cla* I, dando como resultado el constructo 2011. El fragmento *Eco* RI/*Eco* RI del Constructo ID núm. 2011 se subclonó en el sitio *Eco* RI de pEE12.1 generando el ID de constructo núm. 2053 que comprendía el ADN que codificaba una proteína de fusión de albúmina que contenía la secuencia líder y la forma madura de IFNb, seguida de la proteína madura HSA.

Se sintetizaron dos oligonucleótidos adecuados para la amplificación por PCR del polinucleótido que codificaba la totalidad de IFNb, IFNb-1 y IFNb-2:

IFNb-1: 5'-GCGCGGATCCGAATTCCGCCGCCATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCTCTGTTGTGCTTCTCCACTACAGCTCTTTCCATGAGCTACAACCTGCTTGG-3' (SEQ ID NO:107)

IFNb-2: 5'-GCGCGCATACGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCGTTTCGGA GGTAACCTGT-3' (SEQ ID NO: 108)

El cebador IFNb-1 incorpora un sitio de clonación *Bam* HI (que se muestra subrayado), un sitio de clonación *Eco* RI, y una secuencia Kozak (que se muestra en cursiva), seguido de 80 nucleótidos que codifican los primeros 27 aminoácidos de la forma completa de IFNb. En IFNb-2, el sitio *Cla* I (que se muestra subrayado) y el ADN que lo sigue son el complemento inverso del ADN que codifica los primeros 10 aminoácidos de la proteína HSA madura (SEQ ID NO: 1) y los últimos 18 nucleótidos son el complemento inverso del ADN que codifica los últimos 6 residuos de aminoácido de IFNb (véase el Ejemplo 2). Se generó un amplímero de PCR utilizando estos cebadores, se purificó, se digirió con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Cla* I, y se clonó en los sitios *Bam* HI y *Cla* I del vector pC4:HSA. Una vez confirmada la secuencia, se subclonó un fragmento *Eco* RI que contenía el casete de expresión de IFNb y albúmina en pEE12.1 digerido con *Eco* RI.

Adicionalmente, el análisis del extremo N de la proteína de fusión de albúmina expresada mediante secuenciación de aminoácidos puede confirmar la presencia de la secuencia de IFNb esperada (véase más abajo).

Las proteínas de fusión de IFNb y albúmina de la invención comprenden preferiblemente la forma madura de HSA, es decir, Asp-25 a Leu-609, fusionada al extremo N o C de la forma madura de IFNb, es decir, Met-22 a Asn-187. En una realización de la invención, las proteínas de fusión de IFNb y albúmina de la invención comprenden adicionalmente una secuencia señal que dirige el polipéptido de fusión naciente a las rutas secretoras del anfitrión utilizadas para la expresión. En una realización preferida adicional, el péptido señal codificado por la secuencia señal se retira, y la proteína de fusión de IFNb y albúmina madura se secreta directamente al medio de cultivo. Las proteínas de fusión de IFNb y albúmina de la invención pueden comprender secuencias señal heterólogas incluyendo, pero no limitadas a, MAF, INV, Ig, Fibutina B, Clusterina, Proteína 4 de Unión al Factor de Crecimiento de tipo Insulínico, secuencias líder de HSA variantes incluyendo, pero no limitadas a, secuencia líder HSA/MAF quimérica, u otras secuencias señal heterólogas conocidas en la técnica. En una realización preferida, las proteínas de fusión de IFNb y albúmina de la invención comprenden el IFNb nativo. En otras realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de IFNb y albúmina de la invención comprenden adicionalmente un residuo de metionina N-terminal. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, incluyendo los fragmentos y/o variantes, también están incluidos en la invención.

Expresión y purificación del ID de constructo 2053.

Expresión en líneas celulares NSO de mieloma murino

El ID de constructo núm. 2053, pEE12.1:IFNb-HSA, se sometió a electroporación en células NSO mediante métodos conocidos en la técnica (véase el Ejemplo 6).

Purificación del sobrenadante de células NSO

La purificación de IFNb-HSA del sobrenadante de células NSO puede implicar cromatografía de intercambio aniónico con Q-Sefarosa a pH 7,4 utilizando un gradiente de NaCl de 0 a 1 M en Tris-HCl 20 mM, seguida de cromatografía de intercambio aniónico en Poros PI 50 a pH 6,5 con un gradiente de citrato de sodio de 5 a 40 mM, y diafiltración 6 DV en citrato 10 mM, pH 6,5 y NaCl 140 mM, la composición final de tampón. La secuenciación N-terminal proporcionaría la secuencia MSYNLL que es el extremo amino de la forma madura de IFNb. La proteína tiene un PM aproximado de 88,5 kDa.

Para una purificación a mayor escala, p. ej., se pueden concentrar 50 L de sobrenadante de células NSO, en ~8 a 10 L. La muestra concentrada se puede hacer pasar a continuación sobre una columna de intercambio aniónico con Q-Sefarosa (10 x 19 cm, 1,5 L) a pH 7,5 utilizando una elución por etapas que consiste en NaOAc 50 mM, pH 6,0 y NaCl 150 mM. La muestra eluida se puede inactivar viralmente a continuación con Triton-X 100 al 75% durante 60 min a la temperatura ambiente. La cromatografía de fase inversa SDR (10 cm x 10 cm, 0,8 L) se puede emplear después a pH 6,0 con NaOAc 50 mM y NaCl 150 mM, o alternativamente, se puede hacer pasar la muestra sobre una columna de SP-sefarosa a pH 4,8 utilizando una dilución por etapas de NaOAc 50 mM, pH 6,0, y NaCl 150 mM. Seguiría una filtración DV 50 para eliminar cualquier contenido viral. Puede estar seguido de una cromatografía con Fenil-650M (20 cm x 12 cm, 3,8 L) a pH 6,0 utilizando una elución por etapas que consiste en (NH₄)₂SO₄ 350 mM y NaOAc 50 mM, o alternativamente consiste en NaOAc 50 mM pH 6,0. La diafiltración durante 6-8 DV permitirá el intercambio de tampón en el tampón de la formulación final deseada de Na₂HPO₄ 10 mM + sacarosa 58 mM + NaCl 120 mM, pH 7,2 o citrato 10 mM, pH 6,5, y NaCl 140 mM o Na₂HPO₄ 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,2.

La actividad de IFN β se puede analizar utilizando un análisis ISRE-SEAP in vitro

Todas las proteínas de interferón de tipo 1 señalizan a través de un complejo receptor común y una ruta de señalización Jak/STAT similar que culmina en la activación de los genes sensibles a Interferón, "IFN" por medio del Elemento de Respuesta a la Secuencia de Interferón, "ISRE". Un análisis conveniente para la actividad de IFN de tipo 1 es un sistema de análisis basado en el promotor-indicador que contiene múltiples copias del elemento ISRE fusionado a un gen indicador aguas abajo. Se puede generar una línea celular HEK293 estable y contiene una copia integrada establemente de un gen indicador ISRE-SEAP que es extremadamente sensible a los IFN de tipo 1 y presenta linealidad a lo largo de 5 logs de concentración.

Método de escrutinio de clones estables en NS0 con IFN β -HSA

El constructo 2053 se sometió a electroforesis en células NS0 como se describe en el Ejemplo 6. Las células NS0 transfectadas con el ID de constructo núm. 2053 se escrutaron para determinar la actividad sometiendo a ensayo el medio de crecimiento acondicionado en el análisis ISRE-SEAP. Las células indicadoras ISRE-SEAP/293F se cultivaron en placa a 3×10^4 células/pocillo en placas recubiertas con poli-D-lisina, de 96 pocillos, un día antes del tratamiento. Las células indicadoras se trataron con diferentes diluciones (incluyendo pero no limitadas a 1:500 y 1:5000) de sobrenadante acondicionado o preparaciones purificadas de proteína de fusión de IFN β y albúmina codificada por el ID de constructo 2053 o rhIFN β como control. Las células indicadoras se incubaron a continuación durante horas antes de separar 40 μ L para su uso en el Análisis de Quimioluminiscencia de Gen Indicador SEAP (Catálogo Roche núm. 1779842). Se utilizó Interferon beta humano recombinante, "rhIFN β " (Biogen), como control positivo.

Resultado

La preparación purificada de IFN β -HSA expresada por NS0 tenía una CE50 de $9,3 \times 10^{-9}$ g/mL mayor la de rhIFN β (Biogen) que tenía una CE50 de $1,8 \times 10^{-10}$ g/mL (véase la Figura 4).

Inducción in vivo de OAS por un interferón**Método**

La enzima OAS, 2'-5'-OligoAdenilato Sintasa, es activada a nivel transcripcional por el interferón en respuesta a una infección antiviral. El efecto de los constructos de interferón se puede medir obteniendo muestras de sangre de monos tratados y analizando estas muestras para determinar la activación transcripcional de dos ARNm de OAS, p41 y p69. Se puede obtener un volumen de 0,5 mL de sangre completa de 4 animales por grupo en 7 puntos temporales diferentes, día 0, día 1, día 2, día 4, día 8, día 10, y día 14 por animal. Los diversos grupos pueden incluir inyección de control de vehículo, inyección intravenosa y/o subcutánea de 30 μ g/kg y/o 300 μ g/kg de proteína de fusión de IFN y albúmina el día 1, e inyección subcutánea de 40 μ g/kg de Interferon alfa (Schering-Plough) como control positivo los días 1, 3, y 5. Los niveles de los transcritos de ARNm p41 y p69 se pueden determinar mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Taqman) utilizando sondas específicas para p41-OAS y p69-OAS. Los niveles de ARNm de OAS se pueden cuantificar con respecto al control endógeno de ARN ribosomal 18S.

Inducción in vivo de OAS por proteína de fusión de interferón beta y albúmina codificada por el ID de constructo 2053.**Método**

La actividad de la proteína de fusión de HSA-IFN β codificada por el constructo 2053 se puede analizar en el análisis de OAS *in vivo* como se ha descrito anteriormente en el encabezamiento de la subsección "Inducción in vivo de OAS por un interferón".

Ejemplo 77: Indicaciones para proteínas de fusión de IFN α 2 y albúmina

La proteína de fusión de IFN α 2 y albúmina (incluyendo, pero no limitado a, la codificada por el constructo 2053) se puede utilizar para tratar, prevenir, mejorar y/o detectar la esclerosis múltiple. Otras indicaciones incluyen, pero no se limitan a infecciones virales, incluyendo síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y otras infecciones por coronavirus; filovirus, incluyendo pero no limitados, virus Ébola y virus Marburg; Arenavirus, incluyendo pero no limitados a, virus Pichende, virus de Lassa, virus Junín, virus Machupo, virus Guanarito; y virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV); Bunyavirus, incluyendo pero no limitados a, virus de Punta Toro, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la fiebre de flebotomos, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de La Crosse, y hantavirus; Flavivirus, incluyendo pero no limitados a, fiebre amarilla, virus Banzi, virus del Nilo Occidental, virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre hemorrágica de Omsk, y virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur; Togavirus, incluyendo pero no limitados a, virus de la encefalitis equina de Venezuela, este y oeste, virus del río Ross, y virus de la rubéola; Ortopoxvirus, incluyendo pero no limitados a, Vaccinia, viruela bovina, viruela, y viruela del mono; Virus del herpes; InfluenzaA/B; virus respiratorio sincitial (VSR); parainfluenza; sarampión; rinovirus; adenovirus; virus del bosque de Semliki; fiebres hemorrágicas virales; Rhabdovirus; Paramixovirus, incluyendo pero no limitados a, virus Nipah y virus Hendra; y otros agentes virales

identificados por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos como agentes de enfermedades de alta prioridad (es decir, agentes de Categoría A, B, y C; véanse, por ejemplo, Moran, *Emerg. Med. Clin. North. Am.* 2002; 20(2): 311-30 y Darling et al., *Emerg. Med. Clin. North. Am.* 2002; 20 (2):273-309).

Ejemplo 78: ID de constructo Núm. 3691. IFNa2-HSA, Generación.

- 5 El ID de constructo 2249, pSAC35:IFNa2.HSA, comprende ADN que codifica una proteína de fusión de IFNa2 y albúmina que tiene la secuencia líder quimérica de HSA, seguida de la forma madura de la proteína IFNa2, es decir, C1-E165, fusionada al extremo amino de la forma madura de HSA en el vector de expresión pSAC35 de levadura *S. cerevisiae*.

Clonación del ADNc de IFNa2

- 10 El polinucleótido que codificaba IFNa2 se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores IFNa2-1 e IFNa2-2, descritos a continuación. Se cortó el amplímero de la PCR con *Sal* I/*Cla* I, y se ligó en pScCHSA cortado con *Xho* I/*Cla* I. El ID de constructo núm. 2249 codifica una proteína de fusión de albúmina que contiene la secuencia líder quimérica de HSA, la forma madura de IFNa2, seguida de la proteína madura HSA.

- 15 Se sintetizaron dos oligonucleótidos adecuados para la amplificación por PCR del polinucleótido que codificaba la forma madura de IFNa2, IFNa2-1 y IFNa2-2:

IFNa2-1: 5'-CGCGCGCGTCGACAAAAGATGTGATCTGCCTCAAACCCACA-3' (SEQ ID NO: 109)

IFNa2-2: 5'-GCGCGCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCTTCCTTACTTCTTAACTTTCT-3' (SEQ ID NO: 110)

- 20 El cebador IFNa2-1 incorpora un sitio de clonación *Sal* I (que se muestra subrayado), nucleótidos que codifican los últimos tres residuos de aminoácido de la secuencia líder de HS quimérica, así como 22 nucleótidos (que se muestran en negrita) que codifican los primeros 7 residuos de aminoácido de la forma madura de IFNa2. En IFNa2-2, el sitio *Cla* I (que se muestra subrayado) y el ADN que le sigue son el complemento inverso del AD que codifica los primeros 10 aminoácidos de la proteína madura HSA y los últimos 22 nucleótidos (que se muestran en negrita) son el complemento inverso del ADN que codifica los últimos 7 residuos de aminoácido de IFNa2 (véase el Ejemplo 2). Se generó un amplímero de PCR de IFNa2-HSA utilizando estos cebadores, se purificó, se digirió con las enzimas de restricción *Sal* I y *Cla* I, y se clonó en los sitios *Xho* I y *Cla* I del vector pScCHSA. Una vez confirmada la secuencia, el casete de expresión que codificaba esta proteína de fusión de IFNa2 y albúmina se subclonó en pSAC35 digerido con *Not* I.

- 30 Adicionalmente, el análisis del extremo N de la proteína de fusión de albúmina expresada mediante secuenciación de aminoácidos puede confirmar la presencia de la secuencia de IFNa2 esperada (véase más abajo).

- Se han construido otras proteínas de fusión de IFNa2 y albúmina utilizando diferentes secuencias líder mediante métodos conocidos en la técnica (véase el Ejemplo 2). Los Ejemplos de las diversas secuencias líder incluyen, pero no se limitan a, invertasa "INV" (constructos 2343 y 2410) y factor de apareamiento alfa "MAF" (constructo 2366). Estas proteínas de fusión de IFNa2 y albúmina se pueden subclonar en vectores de expresión de mamífero tales como pC4 (constructos 2382) y pEE12.1 como se ha descrito previamente (véase el Ejemplo 5). También se pueden construir proteínas de fusión de IFNa2 y albúmina con la porción terapéutica fusionada en el extremo C a HSA (constructo 2381).

- Las proteínas de fusión de IFNa2 y albúmina de la invención preferiblemente comprenden la forma madura de HSA, es decir, Asp-25 a Leu-609, fusionada al extremo N o C de la forma madura de IFNa2, es decir Cys-1 a Glu-165. En una realización de la invención, las proteínas de fusión de IFNa2 y albúmina de la invención comprenden adicionalmente una secuencia señal que dirige el polipéptido de fusión naciente a las rutas secretoras del anfitrión utilizado para la expresión. En una realización preferida adicional, el péptido señal codificado por la secuencia señal se retira, y la proteína de fusión de IFNa2 y albúmina madura se secreta directamente al medio de cultivo. Las proteínas de fusión de IFNa2 y albúmina de la invención pueden comprender secuencias señal heterólogas incluyendo, pero no limitadas a, MAF, INV, Ig, Fibulina B, Clusterina, Proteína 4 de Unión al Factor de Crecimiento de tipo Insulínico, secuencias líder de HSA variantes incluyendo, pero no limitadas a, una secuencia líder de HSA/MAF quimérica, u otras secuencias señal heterólogas conocidas en la técnica. En una realización preferida, las proteínas de fusión de IFNa2 y albúmina de la invención comprende el IFNa2 nativo. En otras realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de IFNa2 y albúmina de la invención comprenden adicionalmente un residuo de metionina N-terminal. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, incluyendo los fragmentos y/o variantes, también están incluidos en la invención.

Expresión y purificación del ID de constructo 2249

Expresión en levadura *S. cerevisiae*

La transformación del constructo 2249 en la levadura *S. cerevisiae* cepa BXP10 se llevó a cabo mediante métodos

conocidos en la técnica (véase el Ejemplo 3). Las células se pueden recoger en la fase estacionaria después de 72 horas de crecimiento. Los sobrenadantes se recogen aclarando las células a 3000g durante 10 min. Los niveles de expresión se examinan mediante detección por inmunotransferencia con suero anti-HSA (Kent Laboratories) o como anticuerpo primario. Se puede obtener una proteína de fusión de IFNa2 y albúmina con un peso molecular aproximado de 88,5 kDa.

Purificación de sobrenadante de células de la levadura *S. cerevisiae*

El sobrenadante de células que contienen la proteína de fusión de IFNa2 y albúmina expresada a partir del ID de constructo núm. 2249 en células de levadura *S. cerevisiae* se puede purificar a pequeña escala sobre una columna de afinidad de péptido Dyax (véase el Ejemplo 4) o a gran escala siguiendo 5 etapas: diafiltración, cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna de Flujo Rápido de DEAE-Sefarosa, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) utilizando una columna de Butil 650S, cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna de Flujo Rápido de SP-Sefarosa o una cromatografía de Blue-Sefarosa, y cromatografía de alto rendimiento utilizando una columna de alto rendimiento de Q-Sefarosa (véase el Ejemplo 4). La proteína de fusión de IFNa2 y albúmina se puede hacer eluir de la columna de Flujo Rápido de DEAE-Sefarosa con NaCl 100 - 250 mM, de la columna de Flujo Rápido de SP-Sefarosa con NaCl 150 - 250 mM, y de la columna de Alto Rendimiento de Q-Sefarosa a 5 - 7,5 mS/cm. La secuenciación N-terminal debe proporcionar la secuencia CDLPQ (SEQ ID NO: 98) que corresponde a la forma madura de IFNa2.

La actividad de IFNa2 se puede analizar utilizando un análisis ISRE-SEAP in vitro

Método

La proteína de fusión de IFNa2 y albúmina codificada por el ID de constructo núm. 2249 se puede someter a ensayo para determinar la actividad en el análisis ISRE-SEAP como se ha descrito previamente en el Ejemplo 76. En resumen, los sobrenadantes de levadura acondicionados se sometieron a ensayo a una dilución 1:1000 para determinar su capacidad para una transducción de la señal ISRE directa sobre la línea celular indicadora ISRE-SEAP/293F. Las células indicadoras ISRE-SEAP/293F se cultivaron en placa a 3×10^4 células/pocillo en placas recubiertas con poli-D-lisina, de 96 pocillos, un día antes del tratamiento. A continuación las células indicadoras se incubaron durante 18 o 24 horas antes de separar 40 µL para su uso en el Análisis de Quimioluminiscencia del Gen Indicador SEAP (Roche núm. catálogo 1779842). Se utilizó el interferón beta humano recombinante, "rhIFNb" (Biogen), como control positivo.

Resultado

La preparación purificada de IFNa2-HSA demostró un incremento relativamente lineal en el análisis ISRE-SEAP a lo largo de concentraciones que oscilaban de 10^{-1} a 10^1 ng/mL (véase la Figura 5) o 10^{-10} a 10^{-8} ng/mL (véase la Figura 6).

Inducción in vivo de OAS por la fusión con interferon alfa codificada por el ID de constructo 2249

Método

La enzima OAS, 2'-5'-OligoAdenilato Sintasa, se activa a nivel transcripcional por el interferón en respuesta a la infección antiviral. El efecto de los constructos de interferón se puede medir obteniendo muestras de sangre de monos tratados y analizando estas muestras para determinar la activación transcripcional de dos ARNm de OAS, p41 y p69. Se obtuvo un volumen de 0,5 mL de sangre completa de 4 animales por grupo a 7 puntos temporales diferentes, día 0, día 1, día 2, día 4, día 8, día 10, y día 14 por animal. Los diversos grupos incluyen vehículo de control, inyección intravenosa de 30 µg/kg de HSA-IFN el día 1, inyección subcutánea de 30 µg/kg de HSA-IFN el día 1, inyección subcutánea de 300 µg/kg de HSA-IFN el día 1, e inyección subcutánea de 40 µg/kg de Interferon alfa (Schering-Plough) como control positivo los días 1, 3, y 5. Los niveles de los transcritos de ARNm de p41 y p69 se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Taqman) utilizando sondas específicas para p41-OAS y p69-OAS. Los niveles de ARNm de OAS se cuantificaron con respecto a un control endógeno de ARN ribosomal 18S. La fusión de albúmina codificada por el constructo 2249 se puede someter a experimentación similar.

Resultados

Se observó un incremento significativo en los niveles de transcrito de ARNm para las OAS p41 y p69 en monos tratados con HSA-interferón en contraste con los monos tratados con IFNa (véase la Figura 7 para los datos de p41). El efecto duró casi 10 días.

Ejemplo 79: Indicaciones para las proteínas de fusión de IFNa2 y albúmina

Se puede utilizar la proteína de fusión de IFN alfa y albúmina (incluyendo, pero no limitada a, aquellas codificadas por los constructos 2249, 2343, 2410, 2366, 2382, y 2381) para tratar, prevenir, aliviar, y/o detectar la esclerosis múltiple. Otras indicaciones incluyen, pero no se limitan a infecciones virales que incluyen Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SRAG) y otras infecciones por coronavirus; filovirus, incluyendo pero no limitados a virus del Ébola y

virus Marburg; Arenavirus, incluyendo pero no limitados a virus Pichende, virus Lassa, virus Junin, virus Machupo, virus Guanarito; y virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML); Bunyavirus, incluyendo pero no limitados a virus Punta toro, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la fiebre los flebotomos, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus La Crosse, y hantavirus; Flavivirus, incluyendo pero no limitados a fiebre amarilla, virus Banzai, virus del Nilo Occidental, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre hemorrágica de Omsk, y virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur; Togavirus, incluyendo pero no limitados a, virus de la encefalitis equina de Venezuela, este y oeste, virus del río Ross, y virus de la rubéola; Ortopoxvirus, incluyendo pero no limitados a, Vaccinia, viruela bovina, viruela, y viruela del mono; Virus del herpes; Influenza A/B; virus respiratorio sincitial (VSR); parainfluenza; sarampión; rinovirus; adenovirus; virus del bosque de Semliki; fiebres hemorrágicas virales; Rhabdovirus; Paramixovirus, incluyendo pero no limitados a, virus Nipah y virus Hendra; y otros agentes virales identificados por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos como agentes de enfermedades de alta prioridad (es decir, agentes de Categoría A, B, y C; véanse, por ejemplo, Moran, Emerg. Med. Clin. North. Am. 2002; 20(2): 311-30 y Darling et al., Emerg. Med. Clin. North. Am. 2002; 20 (2):273-309).

Preferiblemente, la proteína de fusión de IFN α -albúmina o la proteína de fusión de híbrido de IFN se administran combinadas con un antagonista de CCR5, adicionalmente asociado con al menos uno de ribavirina, IL-2, IL-12, pentafusida sola o combinada con una terapia con fármacos anti-VIH, p. ej., HAART, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones por VIH-1, VHC o infecciones simultáneas de VIH-1 y VHC en pacientes adultos y pediátricos no sometidos a tratamiento previo así como que han experimentado tratamiento.

Ejemplo 80: ID de constructo núm. 3691, BNP-HSA, Generación

El ID de constructo núm. 3691, pC4:SPCON.BNP1-32/HSA, comprende ADN que codifica una proteína de fusión de BNP y albúmina que tiene una secuencia líder consenso, secreción, seguida del péptido BNP activo, procesado (aminoácidos 1-32) fusionado al extremo amino de la forma madura de HSA en el vector de expresión de mamífero pC4.

Clonación del ADNc de BNP para el constructo 3691

El polinucleótido que codificaba BNP se amplificó por PCR utilizando los cebadores BNP-1 y BNP-2, descritos más abajo, se cortó con *Bam* HI/*Cla* I, y se ligó en pC4:HSA cortado con *Bam* HI/*Cla* I dando como resultado el ID de constructo núm. 3691. El ID de constructo núm. 3691 codifica una proteína de fusión de albúmina que contiene una secuencia líder consenso (SEQ ID NO: 111) y la forma activa, procesada de BNP, seguida de la proteína madura de HSA (véase el SEQ ID NO: 321 para el constructo 3691 en la Tabla 2).

Se sintetizaron dos oligonucleótidos adecuados para la amplificación por PCR del polinucleótido que codificaba la forma procesada, activa de BNP, BNP-1 y BNP-2:

BNP-1: 5'-GAGCGCGGATCCAAGCTTCGCCATCATGTGGTGGCGCCTGTGGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTTGCCATGGTGTTGGGCCAGCCCCAAGCTGGTGCAAGG -3' (SEQ ID NO:463)

BNP-2: 5'-AGTCCCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCATGCCGCCTCAGCACTTTGC-3' (SEQ ID NO: 464).

BNP-1 incorpora un sitio de clonación *Bam* HI (subrayado), los polinucleótidos que codifican la secuencia líder consenso (SEQ ID No: 111) (en cursiva), y los polinucleótidos que codifican la secuencia de los primeros siete aminoácidos de BNP (en negrita). En BNP-2, la secuencia subrayada es un sitio *Cla* I, y los polinucleótidos que siguen contienen el complemento inverso del ADN que codifica los últimos 6 aminoácidos de BNP (en negrita) y los primeros 10 aminoácidos de la proteína madura de HSA. Utilizando estos dos cebadores se amplificó mediante PCR la proteína BNP. Las temperaturas y los tiempos de hibridación y extensión se deben determinar empíricamente para cada par de cebadores y molde específicos.

El producto de la PCR se purificó (por ejemplo, utilizando Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp)) y a continuación se digirió con *Bam* HI y *Cla* I. Después de una purificación adicional del fragmento *Bam* HI-*Cla* I mediante electroforesis en gel, el producto se clonó en pC4:HSA digerido con *Bam* HI /*Cla* I para producir el ID de constructo núm. 3691. Se verificó la secuencia del constructo de expresión.

Expresión y Purificación del ID de constructo 3691

Expresión en células 293F

El ID de constructo núm. 3691, pC4:SPCON.BNP1-32/HSA, se transfectó en células 293F mediante métodos conocidos en la técnica (véase el Ejemplo 6).

Purificación de sobrenadante de células 293F

Se recogieron dos litros de sobrenadante 3 días después de la transfección. La proteína recombinante se capturó

mediante una columna de 5 ml de Blue Sefarosa CL-6B (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU) y se hizo eluir por medio de NaCl 2 M. El material se unió a una columna HiPrep 16/10 Fenil FF ("High sub") y se hizo eluir mediante MES 20 mM, pH 6,7. BNP-HSA se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna de hidroxiapatita en gradiente de tampón fosfato de sodio (0-20 mS/cm en 200 ml) a pH 6,8. El producto final se cambió a PBS pH 7,2 por medio de una columna de eliminación de la sal HiPrep 26/10 (Amersham Biosciences).

La actividad de BNP-HSA se puede analizar utilizando un análisis NPR-AlcGMP in vitro

El receptor del péptido natrurético A (NPR-A) es el receptor de señalización para BNP, y como tal es responsable de la mayoría de los efectos biológicos de BNP. La bioactividad de BNP está mediada por el dominio guanilil ciclasa de NPR-A que convierte GTP en GMPc tras la activación. Un análisis conveniente para la actividad de BNP consiste en medir la estimulación por BNP de una línea celular 293F que expresa en exceso de manera estable NPR-A. La producción de cGMP en las células después de la exposición a BNP puede ser medida por un ELISA para cGMP.

Método de escrutinio de clones estables de 293F para NPR-A

Se construyó el marco de lectura abierto de NPR-A humana en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen). Se transfectaron establemente células 293F con el ADN plasmídico mediante el método de Lipofectamine y se seleccionaron por medio de 0,8 µg/ml de G418. Los clones 293F/NPR-A estables se escrutaron para determinar la mejor respuesta a BNP recombinante.

Medición de la activación de cGMP

La activación de cGMP por BNP se llevó a cabo en células 293F/NPR-A y se midió por medio del kit de análisis de GMP cíclico CatchPoint (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). En resumen, se lavaron 50.000 células/pocillo de células 293F/NPR-A cultivadas en una placa de 96 pocillos en 80 µl de tampón de prestimulación (Tampón Bicarbonato de Krebs-Ringer con glucosa 10 mM, pH 7,4, bicarbonato de sodio 15 mM, y 3-isobutil-1-metilxantina 0,75 mM). Se añadió BNP-HSA o BNP recombinante en 40 µl de tampón de prestimulación a las células a 37°C durante 10 min. Las células se lisaron con 40 µl de Tampón de Lisis durante 10 min con sacudimiento. Las cantidades de cGMP en los productos lisados se cuantificaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultado

Se determinó la relación dosis-respuesta de BNP-HSA y BNP recombinante (véase la Figura 8). Las actividades máximas del Constructo ID núm. 3691 y BNP recombinante fueron similares ($1,63 \pm 0,016$ vs. $1,80 \pm 0,016$ pm, respectivamente), con valores de CE50 de $28,4 \pm 1,2$, y $0,46 \pm 1,1$ nM, respectivamente.

BNP-HSA disminuye la presión sanguínea in vivo

Método

BNP reduce la presión sanguínea mediante vasodilatación directa así como mediante supresión de los sistemas renina/angiotensina/endotelina/aldosterona. Se sometió a ensayo la capacidad de BNP-HSA para disminuir la presión sanguínea arterial en ratas espontáneamente hipertensas macho de tres meses de edad adquiridas de Taconic (Germantown, NY, USA). Las ratas espontáneamente hipertensas son hipertensas genéticamente con un inicio de presión sanguínea elevada después de los tres meses de edad. Se reconstituyó BNP-HSA o BNP recombinante en 0,3 cc de PBS por rata. Los fármacos se suministraron por medio de inyección en la vena de la cola. Se registraron las presiones sanguíneas sistólica y diastólica mediante el método del manguito en la cola utilizando el Sistema XBP-1000 (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Para cada dato de presión sanguínea, se tomaron 4-5 lecturas consecutivas y se promediaron. Se calculó la presión arterial media (PAM) como $1/3$ presión sistólica + $2/3$ presión diastólica. Para la determinación de la respuesta a la dosis, se midieron las presiones sanguíneas 20 h después de la administración de pC4:SPCON.BNP1-32/HSA a dosis de 0,5, 2, 6, y 18 nmoles/kg.

Resultado

La presión sistólica típica de las ratas espontáneamente hipertensas fue de 180-200 mmHg antes de la administración de la dosis. Un único bolo de 6 nmoles/kg de BNP-HSA suministrado por medio de inyección intravenosa en la vena de la cola disminuyó la presión tanto sistólica como diastólica, lo que representó una reducción de la presión arterial media (PAM) de más de 30 mmHg. La disminución de la presión sanguínea fue estacionaria y continuó durante un día y luego volvió gradualmente a la del momento inicial a lo largo de varios días (véase la Figura 9). En contraste, debido a su aclaramiento espontáneo, un único bolo de 6 nmoles/kg de BNP recombinante, produjo solamente un descenso de la PA; muy transitorio de aproximadamente ~15 mmHg.

Adicionalmente, se determinó la respuesta a la dosis 20 horas después de la inyección de un bolo de BNP-HSA en cuatro ratas espontáneamente hipertensas. Cero con cinco nmoles/kg de BNP-HSA produjeron una reducción media de 7 mmHg de PAM, mientras 6 nmoles/kg de BNP-HSA produjeron una reducción media de 30 mmHg de PAM, y una dosis elevada de 18 nmoles/kg de BNP-HSA solamente disminuyó la presión sanguínea ligeramente más que los 6 nmoles/kg.

Inducción *in vivo* de cGMP en plasma por BNP-HSA**Método**

La activación de cGMP intracelular por BNP da como resultado su liberación desde la célula a la circulación. El nivel de cGMP en plasma se correlaciona con la fisiología cardiovascular y renal inducida por BNP. Se ha utilizado el cGMP en plasma como un biomarcador para la acción de BNP *in vivo*. Para someter a ensayo la inducción de cGMP en plasma por BNP-HSA *in vivo*, ratones C57/BL6 macho de 11 a 12 semanas de edad recibieron un único bolo de BNP recombinante o BNP-HSA a una dosis de 6 nmoles/kg a través de la vena de la cola. Se preparó plasma a partir de tomas de sangre de la cola a los 5, 10, 20, 40, y 80 min para el grupo que recibía las dosis de BNP recombinante y a los 640, 1440, 2880, y 5760 min adicionales para el grupo con BNP-HSA. Los niveles en plasma de los ratones tratados con PBS como vehículo de control se recogieron como momentos cero. Los niveles de cGMP se determinaron mediante un kit de análisis fluorescente para GMP cíclico CatchPoint de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultado

Después de un único bolo intravenoso de 6 nmoles/kg de BNP recombinante o BNP-HSA, los niveles pico de cGMP en plasma sobre el momento inicial se incrementaron 3,9 o 5,6 veces, respectivamente (véase la Figura 10). Adicionalmente, la vida media del deterioro exponencial en la fase uno de cGMP después del tratamiento con BNP fue de 16 min (10 a 42 min, 95%CI), mientras la vida media del deterioro exponencial en la fase uno de cGMP después de la administración de BNP-HSA fue de 1538 min (1017 a 3153 min, CI 95%).

Análisis farmacocinético *in vivo* de la proteína de fusión de BNP y albúmina codificada por el ID de constructo 3691**Método**

Los ratones C57/BL6 macho de 11 a 12 semanas de edad (obtenidos de Ace Animals, Boyertown, PA, USA) pesaban $25,1 \pm 0,12$ g en el momento del estudio. Todos los animales recibieron dosis a un volumen de 10 ml/kg de peso corporal. Se administró PBS a los animales antes de la dosis. Se les inyectó intravenosamente BNP recombinante en la cola o subcutáneamente en la región escapular media.

El análisis farmacocinético se realizó en los siguientes grupos:

Tabla 8.

Grupo	Fármaco	Dosis (mg/kg)	Ruta	N/tiempo	Tiempo (horas)
1	BNP-HSA	2,19	Subcutánea	3	0,5, 2, 6, 16, 24, 32, 48, 72, 96
2	BNP-HSA	2,19	Intravenosa	3	0,083, 2, 6, 16, 24, 32, 48, 72, 96
3	Vehículo	0	Subcutánea	3	Predosis
4	Vehículo	0	Intravenosa	3	Predosis

Se tomaron muestras de sangre de la vena cava inferior, se colocaron en un microrrecipiente recubierto con EDTA, y se almacenaron en hielo. Las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga a 14.000 rpm (16.000 $\times$ g) durante 10 minutos a la temperatura ambiente. El plasma se transfirió a tubos agrupados y se almacenó a -80°C.

Se determinaron las concentraciones de BNP-HSA en muestras de plasma utilizando el Kit de EIA para BNP (Phoenix Pharmaceutical, Belmont, CA, USA). Se generaron las curvas patrón al mismo tiempo sobre la misma placa con muestras de ensayo. El límite de detección fue de 0,11 ng/mL para el BNP recombinante. El análisis detecta BNP recombinante y no presenta reacción cruzada con BNP de ratón.

El análisis se llevó a cabo mediante métodos no compartimentales (WinNonlin; versión 4.1; Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA). En el análisis se utilizó la concentración media en plasma en cada momento. Se utilizó un método trapezoidal lineal arriba/log abajo para calcular el AUCO_t. La extrapolación para AUC_{0-∞} en el infinito se realizó dividiendo la última concentración observada por la constante de la velocidad d de eliminación terminal. Los datos se pesaron uniformemente para estos análisis.

Resultado

- La concentración media en el momento inicial de BNP-HSA en plasma detectada en las muestras pre-dosis fue de aproximadamente 0,081-0,095 µg/ml. Después de una única inyección intravenosa o subcutánea, BNP-HSA tuvo una vida media de eliminación terminal de 11,2 (suministro intravenoso) o 19,3 h (suministro subcutáneo), mientras la vida media de BNP recombinante en los ratones fue de 3,1 min. El análisis no compartimental de BNP-HSA reveló que BNP-HSA tenía las siguientes características:

Tabla 9

	Unidad	Intravenoso	Subcutáneo
$t_{\max}$	h	NA	16
$C_{\max}$	µg/ml	NA	11,2
$t_{1/2, \text{term}}$	h	11,2	19,3
$AUC_{0-\infty}$	(h·µg/ml)/(mg/kg)	658,9	227,9
V_{ss}	ml/kg	37	NA
V_z o V_z/F	ml/kg	53,5	268
CL o CL/F	ml/h/kg	3,3	9,6
MRT	h	11,2	19,8
Biodisponibilidad	%		34,6

$C_{\max}$, concentración pico en plasma del fármaco; $t_{\max}$, tiempo de max concentración en plasma mum; $AUC_{0-\infty}$ área bajo la curva de concentración de fármaco en plasma-tiempo desde tiempo 0 a infinito; $t_{1/2, \text{tem}}$, vida media en la fase de eliminación terminal; CL , aclaramiento después de la dosificación intravenosa; CL/F , aclaramiento aparente después de la dosificación subcutánea; V_{ss} , volumen de distribución en estado estacionario después de la dosificación intravenosa; V_z : volumen de distribución durante la fase terminal después de la dosificación intravenosa; V_z/F , volumen de distribución durante la fase terminal después de la dosificación subcutánea; NA, no aplicable.

- Se seleccionaron cinco puntos en la fase terminal del perfil intravenoso y cuatro puntos en la fase terminal del perfil subcutáneo para el cálculo de la vida media terminal. El AUC resultante durante esta fase terminal fue aproximadamente 10% del AUC total para los perfiles intravenoso y subcutáneo, respectivamente. Esto se compara con solamente 2% y 4% del AUC total para el perfil intravenoso y subcutáneo, respectivamente, cuando se seleccionaron los últimos tres puntos para el cálculo de la vida media terminal.

Ejemplo 81: Constructo ID núm. 3618, BNP(2X)-HSA, Generación

- El ID de constructo núm. 3618, pC4:SPCON.BNP1-32(2x)/HSA, comprende ADN que codifica una proteína de fusión de BNP y albúmina que tiene una secuencia líder consenso, "secreton", seguida de dos péptidos BNP activos, procesados (aminoácidos 1-32) en tándem fusionados al extremo amino de la forma madura de HSA en el vector de expresión de mamífero pC4.

Clonación de ADNc de BNP para el constructo 3618

- Primero se amplificó el polinucleótido que codificaba el radical BNP duplicado a partir de la forma activa procesada de BNP (aminoácidos 1-32) utilizando cuatro cebadores BNP-1, BNP-2, BNP-3, y BNP-4, descritos más abajo, para crear dos fragmentos A y B. Después de la amplificación, se mezclaron dos fragmentos purificados (A y B) en una cantidad equimolar y se utilizaron como molde para la PCR y se amplificaron con dos cebadores BNP-5 y BNP-6, como se describe a continuación. El inserto BNP(2X) se digirió a continuación con *Bam*HI and *Cla*I y se ligó en un vector pC4HSA previamente digerido con *Bam*HI y *Cla*I dando como resultado el constructo 3618. El ID de

constructo núm. 3618 codifica una proteína de fusión de albúmina que contiene una secuencia líder consenso, "secretón" (SEQ ID NO: 111), y dos copias en tándem de la forma activa, procesada de BNP, seguidas de la proteína madura HSA (véase el SEQ ID No: 483 para el constructo 3618 en la Tabla 2).

Primero se sintetizaron cuatro oligonucleótidos adecuados para la amplificación por PCR de los polinucleótidos que codificaban dos fragmentos de proteína BNP:

BNP-1 5'AGCCCCAAGATGGTGCAAGGGTCTGGCTGCTTTGGGAGGAAGATGGACCGGATCAGCTCCTCCAGTG
GCTGGGCTGCAAAGTGCTGAGGCGGCAT-3' (SEQ ID NO:486)

BNP-2 5'-CCTTGCACCATCTTGGGGCTATGCCGCCCCAGCACTTTGC-3' (SEQ ID NO: 487)

BNP-3 5'-GCAAAGTGCTGAGGCGGCATAGCCCCAAGATGGTGCAACG-3' (SEQ ID NO: 488)

BNP-4 5'-AGTCCCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCATGCCGCCTC AGCACTTTGC-3' (SEQ ID NO: 489)

Utilizando el grupo de cebadores BNP-1/BNP-2 y BNP-3/BNP-4, se amplificaron por PCR dos fragmentos de proteínas BNP (A y B, respectivamente). Las temperaturas y los tiempos de hibridación y extensión se deben determinar empíricamente para cada par de cebadores específicos y molde. Los fragmentos A y B se purificaron (por ejemplo, utilizando Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp)), se mezclaron en cantidades equimolares, y se utilizaron como molde para la amplificación por PCR utilizando dos oligonucleótidos adicionales adecuados para la amplificación por PCR. BNP-5 y BNP-6:

BNP-5: 5-GAGCGCGGATCCAAAGCTTCGCCATCATGTGGTGGCGCCTGTGGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GTGGCCCATGGTGTGGGCCAGCCCCAAGCTGGTGCAAGG -3' (SEQ ID NO:463)

BNP-6: 5'-AGTCCCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCATGCCGCCTCAGCACTTTGC-3' (SEQ ID NO: 464)

BNP-5 incorpora un sitio de clonación *Bam* HI (subrayado), polinucleótidos que codifican una secuencia líder consenso (SEQ ID No: 111) (en cursiva), y polinucleótidos que codifican la secuencia de los primeros siete aminoácido de BNP (en negrita). En BNP-6, la secuencia subrayada es un sitio *Cla* I, y los polinucleótidos que la siguen contienen el complemento inverso de ADN que codifica los últimos 6 aminoácidos de BNP (en negrita) y los primeros 10 aminoácidos de la proteína madura HSA. Utilizando estos dos cebadores, se amplificaron mediante PCR una secuencia líder consenso y dos copias en tándem de péptidos BNP activos. Las temperaturas y los tiempos de hibridación y extensión se deben determinar empíricamente para cada par de cebadores específico y molde.

El producto de la PCR se purificó (por ejemplo, utilizando Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp)) y después se digirió con *Bam* HI y *Cla* I. Después de una purificación adicional del fragmento *Bam* HI-*Cla* I mediante electroforesis en gel, el producto se clonó en pC4:HSA digerido con *Bam* HI/*Cla* I para producir el ID de constructo núm. 3618. Se verificó la secuencia del constructo de expresión.

Expresión y purificación del ID de constructo núm. 3618

Expresión en células 293F

El ID de constructo núm. 3618, pC4:SPCON.BNP1-32(2x)/HSA, se transfectó en células 293F mediante métodos conocidos en la técnica (véase el Ejemplo 6).

Purificación de sobrenadante de células 293F

Se purificó pC4:SPCON.BNP1-32(2x)/HSA codificada por el ID de Constructo núm. 3618 como se ha descrito previamente en el Ejemplo 80 en la subsección de encabezamiento "Purificación de sobrenadante de células 203F".

La actividad de BNP(2X)-HSA se puede analizar utilizando un análisis NPR-A/cGMP in vitro

Se puede analizar la actividad de BNP(2X)-HSA codificada por el Constructo ID núm. 3618 *in vitro* utilizando un análisis NPR-A/cGMP como se ha descrito previamente en el Ejemplo 80 en la subsección de encabezamiento "La actividad de BNP-HSA se puede analizar utilizando un análisis NPR-A/cGMP *in vitro*", y "Método de escrutinio de clones estables NPR-A 203F".

Resultado

Se determinó la relación dosis-respuesta de BNP(2X)-HSA y BNP recombinante (véase la Figura 8). Las actividades máximas de BNP(2X)-HSA codificada por el Construto ID núm. 3618, y BNP recombinante fueron similares ($1,68 \pm 0,021$, vs. $1,80 \pm 0,016$ pm, respectivamente), con valores de CE50 de $9,8 \pm 1,1$, y $0,46 \pm 1,1$ nM respectivamente.

La descripción completa de cada documento citado (incluyendo patentes, solicitudes de patente, publicaciones de patente, artículos de revistas, resúmenes, manuales de laboratorio, libros, u otras descripciones) así como la

información disponible a través de Identificadores específicos para bases de datos tales como GenBank, GeneSeq, o el Registro CAS, referidos en esta solicitud se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Además, la memoria descriptiva y la lista de secuencias de cada una de las siguientes solicitudes de los Estados Unidos se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad: Solicitud de los Estados Unidos Núm. 60/542.274, presentada el 4 de Febrero de 2005; Solicitud de los Estados Unidos Núm. 60/549.901, presentada el 5 de Marzo de 2004; Solicitud de los Estados Unidos Núm. 60/556.906, presentada el 29 de Marzo de 2004; y Solicitud de los Estados Unidos Núm. 60/636.603, presentada el 17 de Diciembre de 2004.

WO 2005/077042-----PCT/US/2005/004041

Expediente del Solicitante	Solicitud Internacional
Número de Referencia: PF612PCT	Número: No cedida

10 INDICACIONES RELACIONADAS CON EL MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO

(Norma PCT 13bis)

A. La indicaciones realizadas más abajo se refieren al material biológico depositado referido en la Tabla 3, página 25 de la descripción.

15 B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO: Otros depósitos se identifican en una página adicional:

Nombre del Depósito:
Dirección del Depósito: 10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
Estados Unidos de América

20

	Número de Acceso	Fecha del Depósito		Número de Acceso	Fecha del Depósito
1	PTA-3759	04-Oct-2001	2	PTA-3764	04-Oct-2001
3	PTA-3941	19-Dic-2001	4	PTA-3763	04-Oct-2001
5	PTA-3940	19-Dic-2001	6	PTA-3942	19-Dic-2001
7	PTA-3939	19-Dic-2001	8	PTA-3943	19-Dic-2001
9	PTA-4670	16-Sept-2002	10		

CANADÁ

25 El solicitante reclama que, hasta que una patente Canadiense haya sido expedida basándose en una solicitud o la solicitud haya sido rechazada, o se abandone y no sea susceptible de reposición, o se retire, el Comisionado de Patentes autorice solamente la entrega de una muestra del material biológico depositado referido en la solicitud a un experto independiente nombrado por el Comisionado, el solicitante debe, mediante una declaración descrita, informar a la Oficina Internacional en este sentido antes de completar las preparaciones técnicas para la publicación de la solicitud internacional.

30

NORUEGA

El solicitante de la presente reclama que la solicitud haya sido abierta a la inspección pública (por la Oficina de Patentes Noruega), o haya sido finalmente resuelta por la Oficina de Patentes Noruega sin haber sido abierta a la inspección pública, la entrega de una muestra deberá ser efectuada solamente a un experto en la técnica. La petición a este efecto debe ser presentada por el solicitante a la Oficina de Patentes Noruega a más tardar en el momento en el que esta solicitud esté disponible al público en las Secciones 22 y 33(3) del Acta de Patentes Noruega. Si semejante petición ha sido presentada por el solicitante, cualquier petición realizada por una tercera parte para la entrega de una muestra indicará el experto que la vaya a utilizar. El experto puede ser cualquier persona incluida en la lista de expertos reconocidos elaborada por la Oficina de Patentes Noruega o cualquier persona aprobada por el solicitante en el caso individual.

35

40

AUSTRALIA

5 El solicitante de la presente comunica que la entrega de una muestra de un microorganismo debe ser efectuada solamente antes de la concesión de una patente, o antes de la prescripción, denegación o retirada de la solicitud, a una persona que sea un destinatario experto sin un interés en la invención (Regulación 3.25(3) de las Regulaciones de Patentes Australiana).

FINLANDIA

10 El solicitante de la presente reclama que, hasta que la solicitud haya sido abierta a la inspección (por el Consejo Nacional de Patentes y Regulaciones), o haya sido finalmente decidido por el Consejo Nacional de Patentes y Registro sin haber sido abierta a la inspección pública, la entrega de una muestra se deberá efectuar solamente a un experto en la técnica.

REINO UNIDO

El solicitante de la presente reclama que la entrega de una muestra de un microorganismo se realice solamente a un experto. La petición a este efecto debe ser presentada por el solicitante en la Oficina Internacional antes de completar las preparaciones técnicas para la publicación internacional de la solicitud.

15 DINAMARCA

20 El solicitante de la presente reclama que, hasta que la solicitud se haya abierto a la inspección pública (por la Oficina de Patentes Danesa), o haya sido finalmente decidido por la Oficina de Patentes Danesa sin haber sido abierta a la inspección pública, la entrega de una muestra se deberá efectuar solamente a un experto en la técnica. La petición a este efecto deberá ser presentada por el solicitante a la Oficina de Patentes Danesa a más tardar en el momento en el que la solicitud esté disponible al público en las Secciones 22 y 33(3) del Acta de Patentes danesa. Si semejante petición ha sido presentada por el solicitante, cualquier petición realizada por una tercera parte para la entrega de una muestra indicará el experto que la vaya a utilizar. Ese experto puede ser cualquier persona incluida en una lista de expertos reconocidos proporcionada por la Oficina de Patentes Danesa o cualquier persona aprobada por el solicitante en el caso individual.

25 SUECIA

30 El solicitante de la presente reclama que, hasta que la solicitud haya sido abierta a la inspección pública (por la Oficina de Patentes Sueca), o haya sido finalmente decidido por la Oficina de Patentes Sueca sin haber sido abierta a la inspección pública, la entrega de una muestra se efectuará solamente a un experto en la técnica. La petición a este efecto será presentada por el solicitante a la Oficina Internacional antes de expiración de 16 meses desde la fecha de prioridad (preferiblemente en el Impreso PCT/RO/134 reproducido en el anexo Z del volumen I de la Guía del Solicitante de PCT). Si semejante petición ha sido presentada por el solicitante cualquier petición realizada por una tercera parte para la entrega de una muestra indicará el experto que la vaya a utilizar. El experto puede ser cualquier persona incluida en una lista de expertos reconocidos proporcionada por la Oficina de Patentes Sueca o cualquier persona aprobada por un solicitante en el caso individual.

35 PAÍSES BAJOS

40 El solicitante de la presente reclama que hasta la fecha de una concesión de una patente de los Países Bajos o hasta la fecha en la que la solicitud sea rechazada o retirada o extinguida, el microorganismo deberá estar disponible como se dispone en 31F(1) de las Normas de Patentes solamente para el préstamo de una muestra a un experto. La petición a este efecto debe ser proporcionada por el solicitante a la Oficina de la Propiedad Industrial de los Países bajos antes de la fecha en la cual la solicitud está disponible al público en la Sección 22C o la Sección 25 del Acta de Patentes del Reino de los Países bajos, con independencia de cuál de las dos fechas suceda primero.

Lista de secuencias

<110> Human Genome Sciences, Inc.

<120> Proteínas de fusión de albúmina

<130> PF612PCT

5 <150> 60/542,274

<151> 2004-02-09

<150> 60/549,901

<151> 2004-03-05

<150> 60/556,906

10 <151> 2004-03-29

<150> 60/636,603

<151> 2004-12-17

<160> 489

<170> Patentin Ver. 2.0

15 <210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu
1				5					10					15	

Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln
			20					25					30		

Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu
		35					40					45			

Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys
	50					55					60				

Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu
65					70					75					80

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

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

Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His
		115					120					125			

Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg
	130					135					140				

Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg
145					150					155					160

Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala
				165					170					175	

20

ES 2 567 634 T3

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp

ES 2 567 634 T3

500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala 515 520 525		
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu 530 535 540		
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys 545 550 555 560		
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Gly Lys Lys Leu Val 565 570 575		
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu 580 585		

<210> 2
 <211> 1782
 <212> DNA
 5 <213> Homo sapiens

<400> 2						
gatgcacaca agagtgaggt tgctcatcgg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa	60					
gccttggtgt tgattgcctt tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta	120					
aaatttagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa	180					
aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactctt	240					
cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaaac aagaacctga gagaaatgaa	300					
tgcttcttgc aacacaaaga tgacaaccca aacctccccc gattggtgag accagagggt	360					
gatgtgatgt gcaactgcttt tcatgacaat gaagagacat ttttgaaaaa atacttatat	420					
gaaattgccca gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tccttttctt tgctaaaagg	480					
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg cctggtgcca	540					
aagctcgatg aacttcggga tgaaagggaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaaatgt	600					
gccagtcctc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtggc tcgcctgagc	660					
cagagatttc ccaaagctga gtttgacaga gtttccaagt tagtgacaga tcttaccaaa	720					
gtccacacgg aatgctgcca tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggcggacctt	780					
gccaaagtata tctgtgaaaa tcaggattcg atctccagta aactgaagga atgctgtgaa	840					
aaacctctgt tggaaaaatc ccactgcatt gccgaagtgg aaaatgatga gatgcctgct	900					
gacttgctt cattagctgc tgattttggt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct	960					
gaggcaaagg atgtcttctt gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag gcatcctgat	1020					
tactctgtcg tgctgctgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc	1080					
tgtgccgctg cagatcctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctctt	1140					
gtggaagagc ctcaagaattt aatcaaacaa aactgtgagc tttttgagca gcttggagag	1200					
tacaaattcc agaatgcgct attagttcgt tacaccaaga aagtaccca agtgtcaact	1260					
ccaactcttg tagaggtctc aagaaacctt ggaaaagtgg gcagcaaatg ttgtaaacat	1320					
cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggtcct gaaccagtta	1380					
tgtgtgttgc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca caaaatgctg cacagagtcc	1440					
ttggtgaaca ggcgaccatg cttttcagct ctggaagtgc atgaaacata cgttcccaaa	1500					
gagtttaatg ctgaaacatt caccttccat gcagatatat gcacactttc tgagaaggag	1560					
agacaaatca agaaacaaac tgcacttggt gagcttgtga aacacaagcc caaggcaaca	1620					
aaagagcaac tgaagctgtt tatggatgat ttgcgagctt ttgtagagaa gtgctgcaag	1680					
gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gagggtaaaa aacttgttgc tgcaagtcaa	1740					
gctgccttag gcttataaca tctacattta aaagcatctc ag	1782					

<210> 3
 <211> 609
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 567 634 T3

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	1	5	10	15
Tyr	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	20	25	30	
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	35	40	45	
Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	50	55	60	
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	65	70	75	80
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	85	90	95	
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	100	105	110	
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	115	120	125	
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	130	135	140	
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	145	150	155	160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	165	170	175	
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	180	185	190	
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	195	200	205	
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	210	215	220	
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	225	230	235	240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	245	250	255	
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	260	265	270	
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	275	280	285	
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	290	295	300	
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	305	310	315	320
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser				

325										330					335				
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly				
			340					345					350						
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val				
		355					360					365							
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys				
		370				375					380								
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu				
385					390					395					400				
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys				
				405				410						415					
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu				
			420				425						430						
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val				
		435					440					445							
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His				
	450					455					460								
Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val				
465					470					475					480				
Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg				
				485					490					495					
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe				
			500					505					510						
Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala				
		515					520					525							
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu				
		530				535					540								
Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys				
545					550					555					560				
Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala				
				565					570					575					
Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe				
			580					585					590						
Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly				
		595					600					605							

Leu

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> giro

<223> Péptido enlazador que puede usarse para unir los dominios VH y VL en un scFv.

<400> 4

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

10 1

5

10

15

<210> 5

<211> 394

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5
g c g g c c g c c g g a t g c a a g g g t t c g a a t c c c t t a g c t c t c a t t a t t t t t t g c t t t t t c t c t 60
t g a g g t c a c a t g a t c g c a a a a t g g c a a a t g g c a c g t g a a g c t g t c g a t a t t g g g g a a c t g 120
t g g t g g t t g g c a a a t g a c t a a t t a a g t t a g t c a a g g c g c c a t c c t c a t g a a a c t g t g t a 180
a c a t a a t a a c c g a a g t g t c g a a a g g t g g c a c c t t g t c c a a t t g a a c a c g c t c g a t g a a a 240
a a a t a a g a t a t a t a t a a g g t t a a g t a a a g c g t c t g t t a g a a a g g a a g t t t t c c t t t t t 300
c t t g c t c t c t t g t c t t t t c a t c t a c t a t t t c c t t c g t g t a a t a c a g g g t c g t c a g a t a c a 360
t a g a t a c a a t t c t a t t a c c c c a t c c a t a c a a t g 394

<210> 6
<211> 21
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Lys Val Ser Val Ala Ala Leu Ser Cys Leu Met Leu Val Thr Ala
1 5 10 15
Leu Gly Ser Gln Ala
20

<210> 7
10 <211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido señal de la estaniocalcina

15 <400> 7
Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Leu Leu Val Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Ala

<210> 8
<211> 24
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 8
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg
20

25 <210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

30 Tyr Ser

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 10
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser

<210> 11

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1 5 10 15

 5 Ile Ser Ala

 <210> 12
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (84)
 <223> Xaa es igual a uno cualquiera de Glu o Asp

 <400> 12
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser
 1 5 10 15

 Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala
 20 25 30

 Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp
 35 40 45

 15 Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu
 50 55 60

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

 Val Ser Leu Xaa Lys Arg
 85

 <210> 13
 <211> 24
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 13
 Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

 Tyr Ser Arg Ser Leu Glu Lys Arg
 20

 <210> 14
 25 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 14
 Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg
 20

 30 <210> 15
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 15

Met Asn Ile Phe Tyr Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly
1 5 10 15

Ser Leu Asp Lys Arg
20

<210> 16
<211> 19
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 16
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 17
<211> 29
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Met Glu Arg Ala Ala Pro Ser Arg Arg Val Pro Leu Pro Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Gly Leu Ala Leu Leu Ala Ala Gly Val Asp Ala
20 25

<210> 18
15 <211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Met Met Lys Thr Leu Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Leu Thr Trp Glu
1 5 10 15

Ser Gly Gln Val Leu Gly
20

20 <210> 19
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Met Leu Pro Leu Cys Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Gly Pro
1 5 10 15

Gly Pro Ser Leu Gly
25 20

<210> 20
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 20
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg
20

<210> 21
<211> 18
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> MUTAGEN
 <222> (14) a (18)
 <223> Variante de la secuencia líder nativa de HSA

 <400> 21
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ala Gly Val
 1 5 10 15
 .
 5 Leu Gly

 <210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (14) a (18)
 <223> Variante de la secuencia líder nativa de HSA

 <400> 22
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Gly Val
 1 5 10 15
 15 Leu Gly

 <210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (14) a (18)
 <223> Variante de la secuencia líder nativa de HSA

 25 <400> 23
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Gly Val
 1 5 10 15

 Leu Gly

 <210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 24
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ala Gly Val
 1 5 10 15

 Ser Gly

 <210> 25
 <211> 18
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 25
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Gly Val
 1 5 10 15

 Ser Gly

 <210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>

<221> MUTAGEN

<222> (14) a (18)

<223> Variante de la secuencia líder nativa de HSA

<400> 26

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ala Gly Val
1 5 10 15

5 Ser Gly

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> MUTAGEN

<222> (14) a (18)

<223> Variante de la secuencia líder nativa de HSA

<400> 27

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Gly Val
1 5 10 15

15 Ser Gly

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> MUTAGEN

<222> (14) a (18)

<223> Variante de la secuencia líder nativa de HSA

<400> 28

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Gly Val
1 5 10 15

25 Ser Gly

<210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<221> MUTAGEN

<222> (14) a (23)

<223> Variante de la secuencia líder nativa de HSA

<400> 29

35 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Gly Val
1 5 10 15

Leu Gly Asp Leu His Lys Ser
20

<210> 30

<211> 22

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido señal sintético

<400> 30

Met Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Trp Ala Pro Ala Arg Gly
20

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 31
Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Ser Leu Ala Asn
1 5 10 15

Ala

<210> 32
<211> 29
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Met Asn Ile Phe Tyr Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly
1 5 10 15

Leu Glu His Thr His Arg Arg Gly Ser Leu Asp Lys Arg
20 25

<210> 33
15 <211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Met Lys Leu Ala Tyr Ser Leu Leu Leu Pro Leu Ala Gly Val Ser Ala
1 5 10 15

Ser Val Ile Asn Tyr Lys Arg
20

20 <210> 34
<211> 65
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu Phe Ala
1 5 10 15

Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Gln Thr Thr
20 25 30

Ser Val Asn Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Ala Phe Ala Thr Gln
35 40 45

Thr Asn Ser Gly Gly Leu Asp Val Val Gly Leu Ile Ser Met Ala Lys
50 55 60

Arg
25 65

<210> 35
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 35

ES 2 567 634 T3

Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu Phe Ala
 1 5 10 15
 Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Gln Thr Thr
 20 25 30
 Ser Val Asn Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Ala Phe Ala Thr Gln
 35 40 45
 Thr Asn Ser Gly Gly Leu Asp Val Val Gly Leu Ile Ser Met Ala Glu
 50 55 60
 Glu Gly Glu Pro Lys Arg
 65 70

<210> 36

<211> 58

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador usado para generar un sitio XhoI y ClaI en pPPC0006

<400> 36

gcctcgagaa aagagatgca cacaagagtg aggttgctca tcgatttaaa gatttggg 58

10 <210> 37

<211> 59

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador usado para generar un sitio XhoI y ClaI en pPPC0006

<400> 37

aatcgatgag caacctcact ctgtgtgca tctctttct cgaggctcct ggaataagc 59

<210> 38

<211> 24

20 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador usado para generar un sitio XhoI y ClaI en pPPC0006

<400> 38

25 taaaactta agagtccaat tagc 24

<210> 39

<211> 29

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> cebador usado para generar un sitio XhoI y ClaI en pPPC0006

<400> 39

cacttctcta gagggttgc atatgtctt 29

<210> 40

35 <211> 60

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Misc_Structure

40 <223> Oligonucleótido sintético usado para alterar los sitios de restricción en pPPC0007

<400> 40

aagctgcctt aggctataa taaggcgcg cgccggccg tttaaactaa gcttaattct 60

<210> 41
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> Misc_Structure
 <223> Oligonucleótido sintético usado para alterar los sitios de restricción en pPPC0007

<400> 41
 agaattaagc ttagtttaa cggccggccg gcgcgccta ttataagcct aaggcagctt 60

10 <210> 42
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> cebador directo útil para la generación de la proteína de fusión de albúmina en la que el resto de albúmina
 está en el extremo N-terminal de la Proteína Terapéutica

<220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (18)
 20 <223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (19)
 <223> n = a, t, g o c

25 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (20)
 <223> n = a, t, g o c

<220>
 30 <221> Característica miscelánea
 <222> (21)
 <223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea
 35 <222> (22)
 <223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (23)
 40 <223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (24)
 <223> n = a, t, g o c

45 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (25)
 <223> n = a, t, g o c

<220>
 50 <221> Característica miscelánea
 <222> (26)
 <223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea

- <222> (27)
<223> n = a, t, g o c
- 5 <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (28)
<223> n = a, t, g o c
- 10 <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (29)
<223> n = a, t, g o c
- <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (30)
<223> n = a, t, g o c
- 15 <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (31)
<223> n = a, t, g o c
- 20 <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (32)
<223> n = a, t, g o c
- <400> 42
aagctgcctt aggcttannn nnnnnnnnnn nn 32
- 25 <210> 43
<211> 51
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> cebador inverso útil para la generación de la proteína de fusión de albúmina en la que el resto de albúmina está en el extremo N-terminal de la Proteína Terapéutica
- <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (37)
35 <223> n = a, t, g o c
- <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (38)
<223> n = a, t, g o c
- 40 <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (39)
<223> n = a, t, g o c
- <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (40)
45 <223> n = a, t, g o c
- <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (41)
50 <223> n = a, t, g o c
- <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (42)

<223> n = a, t, g o c
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (43)
 5 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (44)
 <223> n = a, t, g o c
 10 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (45)
 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 15 <221> Característica miscelánea
 <222> (46)
 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 20 <221> Característica miscelánea
 <222> (47)
 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 25 <221> Característica miscelánea
 <222> (48)
 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 30 <221> Característica miscelánea
 <222> (49)
 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 35 <221> Característica miscelánea
 <222> (50)
 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 40 <221> Característica miscelánea
 <222> (51)
 <223> n = a, t, g o c
 <400> 43
 gcgcgcgttt aaacggccgg ccggcgcgcc ttattannnn nnnnnnnnnn n 51
 40 <210> 44
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
Leu Asp Lys Arg
 45 1
 <210> 45
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 45
 Leu Glu Lys Arg
 1

- <210> 46
- <211> 33
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial

- 5 <220>
 <223> cebador directo útil para la generación de la proteína de fusión de albúmina en la que el resto de albúmina está en el extremo C-terminal de la Proteína Terapéutica

- 10 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (19)
 <223> n = a, t, g o c

- 15 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (20)
 <223> n = a, t, g o c

- 20 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (21)
 <223> n = a, t, g o c

- 25 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (22)
 <223> n = a, t, g o c

- 30 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (23)
 <223> n = a, t, g o c

- 35 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (24)
 <223> n = a, t, g o c

- 40 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (25)
 <223> n = a, t, g o c

- 45 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (26)
 <223> n = a, t, g o c

- 50 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (27)
 <223> n = a, t, g o c

- 55 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (28)
 <223> n = a, t, g o c

- 60 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (29)
 <223> n = a, t, g o c

- 65 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (30)
 <223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (31)
 <223> n = a, t, g o c

5 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (32)
 <223> n = a, t, g o c

10 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (33)
 <223> n = a, t, g o c

<400> 46
 aggagcgtcg acaaaagann nnnnnnnnnn nnn 33

15 <210> 47
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador inverso útil para la generación de la proteína de fusión de albúmina en la que el resto de albúmina
 está en el extremo C-terminal de la Proteína Terapéutica

25 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (38)
 <223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (39)
 <223> n = a, t, g o c

30 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (40)
 <223> n = a, t, g o c

35 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (41)
 <223> n = a, t, g o c

40 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (42)
 <223> n = a, t, g o c

45 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (43)
 <223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (44)
 <223> n = a, t, g o c

50 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (45)
 <223> n = a, t, g o c

<220>

<221> Característica miscelánea
 <222> (46)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 5 <221> Característica miscelánea
 <222> (47)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 10 <221> Característica miscelánea
 <222> (48)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 15 <221> Característica miscelánea
 <222> (49)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 20 <221> Característica miscelánea
 <222> (50)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 25 <221> Característica miscelánea
 <222> (51)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 30 <221> Característica miscelánea
 <222> (52)
 <223> n = a, t, g o c

 <400> 47
 ctttaaactcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcnnn nnnnnnnnnn nn 52

 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 48
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
 1 5
 35

 <210> 49
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (1) a (11)
 <223> Secuencia de Kozak

 <400> 49
 45 ccgccaccat g 11

 <210> 50
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> cebador directo útil para la inserción de la proteína terapéutica en el vector pC4: HSA
 <220>

	<221> Característica miscelánea
	<222> (29)
	<223> n = a, t, g o c
	<220>
5	<221> Característica miscelánea
	<222> (30)
	<223> n = a, t, g o c
	<220>
10	<221> Característica miscelánea
	<222> (31)
	<223> n = a, t, g o c
	<220>
	<221> Característica miscelánea
	<222> (32)
15	<223> n = a, t, g o c
	<220>
	<221> Característica miscelánea
	<222> (33)
	<223> n = a, t, g o c
20	<220>
	<221> Característica miscelánea
	<222> (34)
	<223> n = a, t, g o c
	<220>
25	<221> Característica miscelánea
	<222> (35)
	<223> n = a, t, g o c
	<220>
	<221> Característica miscelánea
30	<222> (36)
	<223> n = a, t, g o c
	<220>
	<221> Característica miscelánea
	<222> (37)
35	<223> n = a, t, g o c
	<220>
	<221> Característica miscelánea
	<222> (38)
	<223> n = a, t, g o c
40	<220>
	<221> Característica miscelánea
	<222> (39)
	<223> n = a, t, g o c
	<220>
45	<221> Característica miscelánea
	<222> (40)
	<223> n = a, t, g o c
	<220>
	<221> Característica miscelánea
50	<222> (41)
	<223> n = a, t, g o c
	<220>
	<221> Característica miscelánea
	<222> (42)
55	<223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (43)
 <223> n = a, t, g o c

5 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (44)
 <223> n = a, t, g o c

10 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (45)
 <223> n = a, t, g o c

15 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (46)
 <223> n = a, t, g o c

<400> 50
 ccgccgctcg aggggtgtgt ttcgtcgann nnnnnnnnnn nnnnnn 46

20 <210> 51
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador inverso útil para la inserción de la proteína terapéutica en el vector pC4: HSA

25 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (38)
 <223> n = a, t, g o c

30 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (39)
 <223> n = a, t, g o c

35 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (40)
 <223> n = a, t, g o c

40 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (41)
 <223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (42)
 <223> n = a, t, g o c

45 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (43)
 <223> n = a, t, g o c

50 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (44)
 <223> n = a, t, g o c

<220>
 <221> Característica miscelánea

<222> (45)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 <221> Característica miscelánea
 5 <222> (46)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (47)
 10 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (48)
 <223> n = a, t, g o c

 15 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (49)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 20 <221> Característica miscelánea
 <222> (50)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 <221> Característica miscelánea
 25 <222> (51)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (52)
 30 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (53)
 <223> n = a, t, g o c

 35 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (54)
 <223> n = a, t, g o c

 <220>
 40 <221> Característica miscelánea
 <222> (55)
 <223> n = a, t, g o c

 <400> 51
 agtcccatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcacnnn nnnnnnnnnn nnnnn 55

 45 <210> 52
 <211> 733
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 52

	gggatccgga gcccaaatct tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg	60
	aattcgaggg tgcacgctca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga	120
	tctccccggac tcttgagggt acatgcgtgg tgggtggacgt aagccacgaa gaccctgagg	180
	tcaagttaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg	240
	aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact	300
	ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca acccccatcg	360
	agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc	420
	catccccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct	480
	atccaagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga	540
	ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg	600
	acaagagcag gtggcagcag gggaaagtct tctcatgttc cgtgatgcat gaggctctgc	660
	acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgc	720
	gactctagag gat	733
5	<210> 53 <211> 5 <212> PRT <213> Homo sapiens	
10	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (3) <223> Xaa es igual a cualquiera de los veinte L-aminoácidos de origen natural	
	<400> 53 Trp Ser Xaa Trp Ser 1 5	
15	<210> 54 <211> 86 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> secuencia sintética con 4 copias en tándem del sitio de unión a GAS que se encuentra en el promotor de IRF 1 (Rothman et al., Immunity 1:457-468 (1994)), 18 nucleótidos complementarios al promotor temprano de SV40, y un sitio de restricción XhoI.	
	<400> 54 gcgcctcgag atttccccga aatctagatt tccccgaaat gatttccccg aaatgatttc	60
	cccgaaatat ctgccatctc aattag	86
25	<210> 55 <211> 27 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> secuencia sintética complementaria al promotor de SV40; incluye un sitio de restricción HindIII.	
	<400> 55 gcggcaagct ttttcaaag cctagc 27	
35	<210> 56 <211> 271 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> Protein_Bind <223> Promotor sintético para uso en ensayos biológicos; incluye sitios de unión a GAS que se encuentran en el promotor de IRF 1	
40	<400> 56 ctcgagattt ccccgaaatc tagatttccc cgaaatgatt tccccgaaat gatttccccg	60
	aaatatctgc catctcaatt agtcagcaac catagtcctc cccctaactc cgcccatccc	120

	gcccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa ttttttttat	180
	ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt	240
	ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct t	271
	<210> 57	
	<211> 32	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético complementario a la secuencia genómica humana del promotor de EGR-1; incluye un sitio de restricción XhoI.	
	<400> 57	
10	gcgctcgagg gatgacagcg atagaacccc gg 32	
	<210> 58	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador sintético complementario a la secuencia genómica humana del promotor de EGR-1; incluye un sitio de restricción Hind III.	
	<400> 58	
	gcgaagcttc gcgactcccc ggcacgcct c	31
20	<210> 59	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 59	
25	ggggactttc cc 12	
	<210> 60	
	<211> 73	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador sintético con 4 copias en tándem del sitio de unión a NF-KB (GGGGACTTTCCC), 18 nucleótidos complementarios al extremo 5' de la secuencia de promotor temprano de SV40, y un sitio de restricción XhoI.	
	<400> 60	
	gggggacttc cgggggactt tccggggact ttccgggact ttccatcctg	60
	ccatctcaat tag	73
35	<210> 61	
	<211> 256	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<221> unión_proteína	
	<223> Promotor sintético para uso en ensayos biológicos; incluye sitios de unión a NF-KB.	
	<400> 61	
	ctcgagggga ctttcccgga gactttccgg ggactttccg ggactttcca tctgccatct	60
	caattagtea gcaaccatag tcccgccctt aactccgccc atcccgcccc taactccgcc	120
	cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga	180
	ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg	240
	cttttgcaaa aagctt	256
	<210> 62	
45	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Cebador directo de VH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

<400> 62
 caggtgcagc tggcagtc tgg 23

5 <210> 63
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo de VH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

10 <400> 63
 caggtcaact taaggagtc tgg 23

 <210> 64
 <211> 23
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo de VH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

20 <400> 64
 gaggtgcagc tggaggagtc tgg 23

 <210> 65
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador directo de VH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

 <400> 65
 caggtgcagc tgcaggagtc ggg 23

30 <210> 66
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo de VH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

35 <400> 66
 gaggtgcagc tgttcagtc tgc 23

 <210> 67
 <211> 23
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo de VH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

 <400> 67
 caggtacagc tgcagcagtc agg 23

45 <210> 68
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de JH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

50 <223> Cebador inverso de JH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

<400> 68
 tgaggagacg gtagcaggg tgcc 24

 <210> 69
 <211> 24
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso de JH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

 <400> 69
 10 tgaagagacg gtagcattg tccc 24

 <210> 70
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador inverso de JH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

 <400> 70
 tgaggagacg gtagcaggg ttcc 24

 <210> 71
 20 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso de JH degenerado útil para amplificar los dominios de VH humanos

 25 <400> 71
 tgaggagacg gtagcgtgg tccc 24

 <210> 72
 <211> 23
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de Vkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

 <400> 72
 gacatccaga tgaccagtc tcc 23

 35 <210> 73
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Cebador directo de Vkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

 <400> 73
 gatgtgtga tgactcagtc tcc 23

 <210> 74
 <211> 23
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de Vkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

 <400> 74
 50 gatattgtga tgactcagtc tcc 23

<210> 75
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador directo de Vkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 75
 gaaattgtgt tgacgcagtc tcc 23

10 <210> 76
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo de Vkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

15 <400> 76
 gacatcgtga tgacccagtc tcc 23

<210> 77
 <211> 23
 <212> DNA

20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo de Vkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 77
 gaaacgacac tcacgcagtc tcc 23

25 <210> 78
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo de Vkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

30 <400> 78
 gaaattgtgc tgactcagtc tcc 23

<210> 79
 <211> 23
 <212> DNA

35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo de Vlambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 79
 40 cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

<210> 80
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador directo de Vlambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 80
 cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

<210> 81
 50 <211> 23
 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de Vlambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 81

5 tcctatgtgc tgactcagcc acc 23

<210> 82

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador directo de Vlambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 82

tcttctgagc tgactcagga ccc 23

<210> 83

15 <211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de Vlambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

20 <400> 83

cacgttatac tgactcaacc gcc 23

<210> 84

<211> 23

<212> DNA

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de Vlambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 84

caggctgtgc tcactcagcc gtc 23

30 <210> 85

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador directo de Vlambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 85

aattttatgc tgactcagcc cca 23

<210> 86

<211> 24

40 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de Jkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 86

45 acgtttgatt tccaccttgg tccc 24

<210> 87

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Cebador inverso de Jkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 87
acgtttgatc tccagcttgg tccc 24

5 <210> 88
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de Jkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

10 <400> 88
acgtttgata tccacttgg tccc 24

<210> 89
<211> 24
<212> DNA
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de Jkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 89
acgtttgatc tccaccttgg tccc 24

20 <210> 90
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Cebador inverso de Jkappa degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 90
acgtttaatc tccagtcgtg tccc 24

<210> 91
<211> 23
30 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de Jlambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 91
35 cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

<210> 92
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador inverso de Jlambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 92
cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

<210> 93
45 <211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de Jlambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

50 <400> 93

tcctatgtgc tgactcagcc acc 23

<210> 94
 <211> 23
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de JIambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 94
 tcttctgagc tgactcagga ccc 23

10 <210> 95
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Cebador inverso de JIambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 95
 cacgttatac tgactcaacc gcc 23

<210> 96
 <211> 23
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de JIambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 96
 25 caggctgtgc tcactcagcc gtc 23

<210> 97
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador inverso de JIambda degenerado útil para amplificar los dominios de VL humanos

<400> 97
 aattttatgc tgactcagcc cca 23

<210> 98
 35 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 98
 Cys Asp Leu Pro Gln
 1 5

40 <210> 99
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (23)
 <223> Xaa es igual a Arg o Lys

<220>
 50 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (113)
 <223> Xaa es igual a Ala o Val

<400> 99

```

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1          5          10          15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Xaa Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
      20          25          30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
      35          40          45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
      50          55          60

Asn Leu Phe Thr Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Asp Leu
      65          70          75          80

Leu Asp Lys Phe Cys Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
      85          90          95

Ala Cys Val Met Gln Glu Glu Arg Val Gly Glu Thr Pro Leu Met Asn
      100          105          110

Xaa Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr Leu
      115          120          125

Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
      130          135          140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Arg
      145          150          155          160

Leu Arg Arg Lys Glu
      165

```

5 <210> 100
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (23)
 <223> Xaa es igual a Arg o Lys

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (113)
 <223> Xaa es igual a Ala o Val

<400> 100

ES 2 567 634 T3

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

<210> 101

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (23)

<223> Xaa es igual a Arg o Lys

10 <400> 101

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

<210> 102

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (23)

<223> Xaa es igual a Arg o Lys

10 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (97)

<223> Xaa es igual a Ser o Val

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (98)

<223> Xaa es igual a Cys o Leu

<220>

20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (99)

<223> Xaa es igual a Val o Cys

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (100)

<223> Xaa es igual a Met o Asp

<400> 102

ES 2 567 634 T3

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

<210> 103

<211> 167

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (115)

<223> Xaa es igual a Ala o Val

10 <400> 103

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15

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

<210> 104

<211> 166

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 104

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

10 <210> 105

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido señal sintético

<400> 105
 Met Arg Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Pro Ala Arg Gly
 20

5 <210> 106
 <211> 0
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador (suprimido)

<400> 106
 000

<210> 107
 <211> 106
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para la amplificación de IFNb de longitud completa, tiene sitio de clonación BamHI

<400> 107
 gcgcggatcc gaattccgcc gccatgacca acaagtgtct cctccaaatt gctctcctgt 60
 20 tgtgcttctc cactacagct ctttccatga gctacaactt gcttgg 106

<210> 108
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador para la amplificación de IFNb de longitud completa, tiene sitio de clonación ClaI

<400> 108
 gcgcgcatcg atgagcaacc tcactctgt gtgcatcggt tcggaggtaa cctgt 55

<210> 109
 30 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 109
 cgcgcgctgc gacaaaagat gtgatctgcc tcaaaccac a 41

35 <210> 110
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 40 gcgcgcatcg atgagcaacc tcactctgt gtgcatcttc ctactctt aaactttct 59

<210> 111
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 111

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Pro Met Val Trp Ala
20

<210> 112

<211> 24

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 112

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Leu Asp Lys Arg
20

<210> 113

<211> 1497

10 <212> DNA

<213> Hypocrea jecorina

<400> 113

tctagagttg tgaagtcggt aatcccgctg tatagtaata cgagtcgcat ctaaatactc 60
cgaagctgct gcgaacccgg agaatcgaga tgtgctggaa agcttctagc gagcggctaa 120
attagcatga aaggctatga gaaattcttg agacggcttg ttgaatcatg gcgttccatt 180
cttcgacaag caaagcggtc cgtcgagta gcaggcactc attcccgaaa aaactcggag 240
attcctaagt agcgatggaa ccggaataat ataataggca atacattgag ttgcctcgac 300
ggttgcaatg caggggtact gagcttgac ataactgttc cgtacccac ctcttctcaa 360
cctttggcgt ttccctgatt cagcgtaccc gtacaagtgc taatcactat taaccagac 420
tgaccggacg tgttttgccc ttcatttggg gaaataatgt cattgcgatg tgtaatttgc 480
ctgcttgacc gactggggct gtccgaagcc cgaatgtagg attgttatcc gaactctgct 540
cgtagaggca tgttgtgaat ctgtgtcggg caggacacgc ctcaagggtt cacggcaagg 600
gaaaccacgc atagcagtgct ctagttagca cctgtaaagc cgcaatgcag catcactgga 660
aaatacaaac caatggctaa aagtacataa gttaatgcct aaagaagtca tataccagcg 720
gctaataatt gtacaatcaa gtggctaaac gtaccgtaat ttgccaacgg cttgtggggg 780
tgcagaagca acggcaaagc ccacttccc caggtttgtt tcttactca gtccaatctc 840

agctgggtgat cccccaattg ggtcgcttgt ttgttccggt gaagtgaag aagacagagg 900
taagaatgtc tgactcggag cgttttgcat acaaccaagg gcagtgatgg aagacagtga 960
aatgttgaca ttcaaggagt atttagccag ggatgcttga gtgtatcgtg taaggagggt 1020
tgtctgccga tacgacgaat actgtatagt cacttctggt gaagtgggtc atattgaaat 1080
gtaagtccgc actgaacagg caaaagattg agttgaaact gcctaagatc tcgggccctc 1140
gggccttcgg cctttgggtg tacatgtttg tgctccgggc aaatgcaaag tgtggtagga 1200
tcgaacacac tgctgccttt accaagcagc tgagggtatg tgataggcaa atgttcaggg 1260
gccactgcac ggtttcgaat agaaagagaa gcttagccaa gaacaatagc cgataaagat 1320
agcctcatta aacggaatga gctagtaggc aaagtcagcg aatgtgtata tataaagggt 1380
cgagggtccgt gcctccctca tgctctcccc atctactcat caactcagat cctccaggag 1440
15 acttgtacac catcttttga ggcacagaaa cccaatagtc aaccgcggac tggcatc 1497

<210> 114

<211> 366

<212> DNA

<213> Aspergillus nidulans

20 <400> 114

agatctggtt cctgagtaca tctaccgatg cgcctcgatc cccctcttag ccgcatgaga 60
ttcctaccat ttatgtccta tcgttcaggg tctatttgg accgctagaa atagactctg 120
ctcgatttgt ttccattatt cagcgaatta cgatagtatt tggctctttt cgtttggccc 180
aggtcaattc gggtaagacg cgatcacgcc attgtggcgg ccggcggtgt gctgctgcta 240
ttccccgcac ataacaacc cctccaccag ttcggtgggc tttgcgaatg ctgtactcta 300
tttcaagttg tcaaaagaga ggattcaaaa aattataccc cagatatcaa agatatcaa 366
gccatc

<210> 115

<211> 1646

<212> DNA

25 <213> Hypocrea jecorina

<400> 115

```

tctagagttg tgaagtcggt aatcccgcgt tatagtaata cgagtcgcat ctaaatactc 60
cgaagctgct gcgaaccggg agaatcgaga tgtgctggaa agcttctagc gagcggctaa 120
attagcatga aaggctatga gaaattcttg agacggcctg ttgaatcatg gcgttccatt 180
cttcgacaag caaagcgttc cgtcgcagta gcaggcactc attcccgaaa aaactcggag 240
attcctaagt agcgaatggaa ccggaataat ataataggca atacattgag ttgcctcgac 300
ggttgcaatg caggggtact gagcttggac ataactgttc cgtacccac cttcttctca 360
cctttggcgt ttccctgatt cagcgtaccc gtacaagtcg taatcactat taaccagac 420
tgaccggacg tgttttgccc ttcatTTTgga gaaataatgt cattgcatg tgtaatttgc 480
ctgcttgacc gactggggct gttcgaagcc cgaatgtagg attgttatcc gaactctgct 540
cgtagaggca tgtttgtaat ctgtgtcggg caggacacgc ctgaagggtt caccgcaagg 600
gaaaccaccg atagcagtggt ctagtagcaa cctgtaaagc cgcaatgcag catcactgga 660
aaatacaaac caatggctaa aagtacataa gttaatgcct aaagaagtca tataccagcg 720
gctaataatt gtacaatcaa gtggctaaac gtaccgtaat ttgccaacgg cttgtggggg 780
tgcagaagca acggcaaaagc ccacttccc cagctttgtt tcttactca gtccaatctc 840
agctggtgat ccccaattg ggtcgttgt ttgttccggt gaagtgaag aagacagagg 900
taagaatgtc tgactcggag cgttttgcgt acaaccaagg gcagtgatgg aagacagtga 960
aatgttgaca ttcaaggagt atttagccag ggatgcttga gtgtatctg taaggagggt 1020
tgtctgccga tacgacgaat actgtatagt cacttctggt gaagtgggtc atattgaaat 1080
gtaagtcggc actgaacagg caaaagattg agttgaaact gcctaagatc tcgggcccctc 1140
gggccttcgg cctttgggtg tacatgtttg tgctccgggc aaatgcaaag tgtggttagg 1200
tcgaacacac tgctgccttt accaagcagc tgaggggatg tgataggcaa atgttcaggg 1260
gccactgcgt ggtttcgaaat agaaagagaa gcttagcctg cagcctctta tcgagaaaga 1320
aattaccgtc gctcgtgatt tgtttgcaaa aagaacaaaa ctgaaaaaac ccagacacgc 1380
tcgacttcct gtcttcttat tgattgcagc ttccaatttc gtcacacaac aaggctcctag 1440
cttagccaag aacaatagcc gataaagata gcctcattaa acggaatgag ctagtaggca 1500
aagtcagcga atgtgtatat ataaagggtt gaggtccgtg cctccctcat gctctcccca 1560
tctactcacc aactcagatc ctccaggaga cttgtacacc atcttttgag gcacagaaac 1620

```

ccaatagtea accgcggact ggcacc 1646

<210> 116
 <211> 516
 <212> DNA
 <213> Aspergillus nidulans

```

<400> 116
agatctgggt cctgagtaca tctaccgatg cgcctcgatc cccctcttag ccgcatgaga 60
ttcctaccat ttatgtccta tcgttcaggg tctattttgg accgctagaa atagactctg 120
ctcgatttgt ttccattatt cagcaatta cgatagtatt tggctctttt cgtttggccc 180
aggtcaattc gggtaagacg cgatcacgcc attgtggcgg ccggcgctgc agcctcttat 240
cgagaaagaa attaccgtcg ctctgtgatt gtttgcaaaa agaacaaaac tgaaaaaac 300
cagacacgct cgacttctg tcttctatt gattgcagct tccaatttgc tcacacaaca 360
aggtcctacg ccggcggtgt gctgtgcta ttccccgc ataaacaacc cctccaccag 420
ttcgttgggc ttgtcgaatg ctgtactcta tttcaagtgt tcaaaagaga ggattcaaaa 480
aattataccc cagatatcaa agatatcaaa gccatc 516

```

<210> 117
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

```

<400> 117
tgtgatctgc ctcaaaccac cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctcctgcttg aaggacagac atgacttttg atttccccag 120
gaggagtgtg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgatc 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaaag gactcatctg ctgcttggga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
caggggggtg ggtgacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gagcagaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

```

<210> 118
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 118

```

tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtttg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
cagggggtgg ggggtgacaga gactcccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

```

<210> 119

<211> 495

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 119

```

tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtttg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180

```

```

cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
cagggggtgg ggggtgacaga gactcccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

```

10 <210> 120

<211> 498

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 120

```

tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtttg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
cagggggtgg ggggtgacaga gactcccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaataa 498

```

15 <210> 121

<211> 495

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <400> 121

```

tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtttg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
cagggggtgg ggggtgacaga gactcccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

```

<210> 122

<211> 495

<212> DNA

25 <213> Homo sapiens

<400> 122

	tgtgatctgc	ctcaaaccca	cagcctgggt	tctagaagga	ccttgatgct	cctggcacag	60
	atgaggagaa	tctctctttt	ctcctgcttg	aaggacagac	atgactttgg	atttccccag	120
	gaggagtttg	gcaaccagtt	ccaaaaggct	gaaaccatcc	ctgtcctcca	tgagatgata	180
	cagcagatct	tcaatctctt	cagcacaaag	gactcatctg	ctgcttggga	tgagaccctc	240
	ctagacaaat	tctacactga	actctaccag	cagctgaatg	acctggaagc	ctgtgtgata	300
	cagggggtgg	gggtgacaga	gactcccctg	atgaaggagg	actccattct	ggctgtgagg	360
	aaatacttcc	aaagaatcac	tctctatctg	aaagagaaga	aatacagccc	ttgtgcctgg	420
	gaggttgtca	gagcagaaat	catgagatct	ttttctttgt	caacaaactt	gcaagaaagt	480
	ttaagaagta	aggaa					495
	<210> 123						
	<211> 495						
	<212> DNA						
5	<213> Homo sapiens						
	<400> 123						
	tgtgatctgc	ctcaaaccca	cagcctgggt	tctagaagga	ccttgatgct	cctggcacag	60
	atgaggagaa	tctctctttt	ctcctgcttg	aaggacagac	atgactttgg	atttccccag	120
	gaggagtttg	gcaaccagtt	ccaaaaggct	gaaaccatcc	ctgtcctcca	tgagatgata	180
	cagcagatct	tcaatctctt	cagcacaaag	gactcatctg	ctgcttggga	tgagaccctc	240
	ctagacaaat	tctacactga	actctaccag	cagctgaatg	acctggaagc	ctgtgtgata	300
	cagggggtgg	gggtgacaga	gactcccctg	atgaaggagg	actccattct	ggctgtgagg	360
	aaatacttcc	aaagaatcac	tctctatctg	aaagagaaga	aatacagccc	ttgtgcctgg	420
	gaggttgtca	gagcagaaat	catgagatct	ttttctttgt	caacaaactt	gcaagaaagt	480
	ttaagaagta	aggaa					495
	<210> 124						
	<211> 495						
10	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<400> 124						
	tgtgatctgc	ctcaaaccca	cagcctgggt	tctagaagga	ccttgatgct	cctggcacag	60
	atgaggagaa	tctctctttt	ctcctgcttg	aaggacagac	atgactttgg	atttccccag	120
	gaggagtttg	gcaaccagtt	ccaaaaggct	gaaaccatcc	ctgtcctcca	tgagatgata	180
	cagcagatct	tcaatctctt	cagcacaaag	gactcatctg	ctgcttggga	tgagaccctc	240
	ctagacaaat	tctacactga	actctaccag	cagctgaatg	acctggaagc	ctgtgtgata	300
	cagggggtgg	gggtgacaga	gactcccctg	atgaaggagg	actccattct	ggctgtgagg	360
	aaatacttcc	aaagaatcac	tctctatctg	aaagagaaga	aatacagccc	ttgtgcctgg	420
	gaggttgtca	gagcagaaat	catgagatct	ttttctttgt	caacaaactt	gcaagaaagt	480
	ttaagaagta	aggaa					495
	<210> 125						
	<211> 495						
15	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<400> 125						
	tgtgatctgc	ctcaaaccca	cagcctgggt	tctagaagga	ccttgatgct	cctggcacag	60
	atgaggagaa	tctctctttt	ctcctgcttg	aaggacagac	atgactttgg	atttccccag	120
	gaggagtttg	gcaaccagtt	ccaaaaggct	gaaaccatcc	ctgtcctcca	tgagatgata	180
	cagcagatct	tcaatctctt	cagcacaaag	gactcatctg	ctgcttggga	tgagaccctc	240
	ctagacaaat	tctacactga	actctaccag	cagctgaatg	acctggaagc	ctgtgtgata	300
	cagggggtgg	gggtgacaga	gactcccctg	atgaaggagg	actccattct	ggctgtgagg	360
	aaatacttcc	aaagaatcac	tctctatctg	aaagagaaga	aatacagccc	ttgtgcctgg	420
	gaggttgtca	gagcagaaat	catgagatct	ttttctttgt	caacaaactt	gcaagaaagt	480
	ttaagaagta	aggaa					495
	<210> 126						
	<211> 495						
20	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<400> 126						
	tgtgatctgc	ctcaaaccca	cagcctgggt	tctagaagga	ccttgatgct	cctggcacag	60
	atgaggagaa	tctctctttt	ctcctgcttg	aaggacagac	atgactttgg	atttccccag	120
	gaggagtttg	gcaaccagtt	ccaaaaggct	gaaaccatcc	ctgtcctcca	tgagatgata	180
	cagcagatct	tcaatctctt	cagcacaaag	gactcatctg	ctgcttggga	tgagaccctc	240
	ctagacaaat	tctacactga	actctaccag	cagctgaatg	acctggaagc	ctgtgtgata	300
	cagggggtgg	gggtgacaga	gactcccctg	atgaaggagg	actccattct	ggctgtgagg	360
	aaatacttcc	aaagaatcac	tctctatctg	aaagagaaga	aatacagccc	ttgtgcctgg	420
	gaggttgtca	gagcagaaat	catgagatct	ttttctttgt	caacaaactt	gcaagaaagt	480
	ttaagaagta	aggaa					495
25	<210> 126						
	<211> 495						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<400> 126						
	tgtgatctgc	ctcaaaccca	cagcctgggt	tctagaagga	ccttgatgct	cctggcacag	60
	atgaggagaa	tctctctttt	ctcctgcttg	aaggacagac	atgactttgg	atttccccag	120
	gaggagtttg	gcaaccagtt	ccaaaaggct	gaaaccatcc	ctgtcctcca	tgagatgata	180
	cagcagatct	tcaatctctt	cagcacaaag	gactcatctg	ctgcttggga	tgagaccctc	240
	ctagacaaat	tctacactga	actctaccag	cagctgaatg	acctggaagc	ctgtgtgata	300
	cagggggtgg	gggtgacaga	gactcccctg	atgaaggagg	actccattct	ggctgtgagg	360

aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgctca gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

<210> 127
<211> 501
<212> DNA
5 <213> Homo sapiens

<400> 127
atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttccagtgc tcagaagctc 60
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgcctcaagg acaggatgaa ctttgacatc 120
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt gaccatctat 180
gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat 240
gagactattg ttgagaacct cctggctaata gtctatcatc agataaaacca tctgaagaca 300
gtcctggaag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat gagcagtcgt 360
cacctgaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaagga gtacagtcac 420
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact tttacttcat taacagactt 480
acaggttacc tccgaaacta a 501

<210> 128
<211> 501
10 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 128
atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttccagtgc tcagaagctc 60
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgcctcaagg acaggatgaa ctttgacatc 120
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt gaccatctat 180
gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat 240
gagactattg ttgagaacct cctggctaata gtctatcatc agataaaacca tctgaagaca 300
gtcctggaag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat gagcagtcgt 360
cacctgaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaagga gtacagtcac 420
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact tttacttcat taacagactt 480
acaggttacc tccgaaacta a 501

<210> 129
15 <211> 561
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 129
atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gcttctccac tacagctctt 60
tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag 120
ctcctgtggc aattgaatgg gaggtttgaa tattgcctca aggacaggat gaactttgac 180
atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc 240
tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg 300
aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag 360
acagtctctg aagaaaaact ggagaaaagaa gatttcacca ggggaaaaact catgagcagt 420
ctgcacctga aaagatatga tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt 480
cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt catatacaga 540
cttacaggtt acctccgaaa c 561

<210> 130
20 <211> 498
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 130
atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttccagtgc tcagaagctc 60
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgcctcaagg acaggatgaa ctttgacatc 120
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt gaccatctat 180
gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat 240
gagactattg ttgagaacct cctggctaata gtctatcatc agataaaacca tctgaagaca 300
gtcctggaag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat gagcagtcgt 360
cacctgaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaagga gtacagtcac 420
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact tttacttcat taacagactt 480
25 acaggttacc tccgaaac 498

<210> 131
<211> 561

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 131
atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gttctctccac tacagctctt 60
tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag 120
ctcctgtggc aattgaatgg gaggttgaa tattgcctca aggacaggat gaactttgac 180
atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc 240
tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg 300
aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag 360
acagtcttgg aagaaaaact ggagaaagaa gatttcacca ggggaaaact catgagcagt 420
ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt 480
cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga 540
cttacaggtt acctccgaaa c 561

5 <210> 132
<211> 501
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 132
atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttcagtg tcagaagctc 60
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgcctcaagg acaggatgaa ctttgacatc 120
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt gaccatctat 180
gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat 240
gagactattg ttgagaacct cctggctaatt gtctatcatc agataaacca tctgaagaca 300
gtcctgggag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat gagcagtctg 360
cacctgaaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaaagga gtacagtcac 420
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaagggaact ttacttcat taacagactt 480
acaggttacc tccgaaacta a 501

10 <210> 133
<211> 561
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 133
atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gttctctccac tacagctctt 60
tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag 120
ctcctgtggc aattgaatgg gaggttgaa tattgcctca aggacaggat gaactttgac 180
atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc 240
tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg 300
aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag 360
acagtcttgg aagaaaaact ggagaaagaa gatttcacca ggggaaaact catgagcagt 420
ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt 480

cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga 540
cttacaggtt acctccgaaa c 561

15 <210> 134
20 <211> 561
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 134
atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gttctctccac tacagctctt 60
tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag 120
ctcctgtggc aattgaatgg gaggttgaa tattgcctca aggacaggat gaactttgac 180
atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc 240
tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg 300
aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag 360
acagtcttgg aagaaaaact ggagaaagaa gatttcacca ggggaaaact catgagcagt 420
ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt 480
cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga 540
cttacaggtt acctccgaaa c 561

25 <210> 135
<211> 498
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 135
atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttcagtg tcagaagctc 60
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgcctcaagg acaggatgaa ctttgacatc 120
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt gaccatctat 180
gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat 240
gagactattg ttgagaacct cctggctaata gtctatcatc agataaacca tctgaagaca 300
gtcctggaag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat gagcagtcctg 360
cacctgaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaaagga gtacagtcac 420
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact tttacttcat taacagactt 480
acaggttacc tccgaaac 498

<210> 136

<211> 498

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 136
atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttcagtg tcagaagctc 60
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgcctcaagg acaggatgaa ctttgacatc 120
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt gaccatctat 180
gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat 240
gagactattg ttgagaacct cctggctaata gtctatcatc agataaacca tctgaagaca 300
gtcctggaag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat gagcagtcctg 360
cacctgaaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaaagga gtacagtcac 420
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact tttacttcat taacagactt 480
acaggttacc tccgaaac 498

<210> 137

10 <211> 498

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 137
atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttcagtg tcagaagctc 60
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgcctcaagg acaggatgaa ctttgacatc 120
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt gaccatctat 180
gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat 240
gagactattg ttgagaacct cctggctaata gtctatcatc agataaacca tctgaagaca 300
gtcctggaag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat gagcagtcctg 360
cacctgaaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaaagga gtacagtcac 420
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact tttacttcat taacagactt 480
acaggttacc tccgaaac 498

<210> 138

15 <211> 495

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 138
tgtgatctgc ctcaaaccac cagcctgggt agcaggagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctccctgctt aaggacagac atgacttttg atttccccag 120
gaggagtttg gcaaccagtt ccaaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgatc 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaaag gactcatctg ctgcttggga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acttgggaagc ctgtgtgatg 300
caggaggaga ggggtgggaga aactcccttg atgaatgcgg actccatctt ggctgtgaag 360
aaatacttcc gaagaatcac tctctatctg acagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gagcagaaat catgagatcc ctctctttat caacaaactt gcaagaaaga 480
ttaaggagga aggaa 495

20 <210> 139

<211> 495

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 139

```
tgtgatctgc ctcaaaccce cagcctgggt agcaggagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctcttgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtgtg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgata 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttggga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggagtc ctgtgtgatg 300
caggaagtgg ggggtataga gtctcccttg atgtacgagg actccatcct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctatatctg acagagaaga aatacagctc ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gagcagaaat catgagatcc ttctctttat caatcaactt gcaaaaaaga 480
ttgaagagta aggaa 495
```

<210> 140

<211> 495

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 140

```
tgtgatctgc ctcaaaccce cagcctgggt agcaggagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctcttgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtgtg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgata 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttggga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acatggaagc ctgctgtata 300
caggagggtg ggggtggaaga gactcccttg atgaatgtgg actccatcct ggctgtgaag 360
aaatacttcc aaagaatcac tctttatctg acagagaaga aatacagccc ttgtgcttgg 420
gaggttgtca gagcagaaat catgagatcc ttctctttat caaaaatttt tcaagaaaga 480
ttaaggagga aggaa 495
```

<210> 141

<211> 495

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 141

```
tgtgatctgc ctcaaaccce cagcctgggt agcaggagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctcttgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtgtg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgata 180
cagcagatct tcaacctctt taccacaaa gattcatctg ctgcttggga tgaggaccctc 240
ctagacaaat tctgcaccga actctaccag cagctgaatg acttgggaagc ctgtgtgatg 300
caggaggaga ggggtgggaga aactcccttg atgaatgcgg actccatcct ggctgtgaag 360
aaatacttcc gaagaatcac tctctatctg acagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gagcagaaat catgagatcc ctctctttat caacaaactt gcaagaaaga 480
ttaaggagga aggaa 495
```

<210> 142

15 <211> 495

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 142

```
tgtgatctgc ctcaaaccce cagcctgggt agcaggagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctcttgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtgtg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgata 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttggga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acttgggaagc ctgtgtgatg 300
caggaggaga ggggtgggaga aactcccttg atgaatgcgg actccatcct ggctgtgaag 360
aaatacttcc gaagaatcac tctctatctg acagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gagcagaaat catgagatcc ctctctttat caacaaactt gcaagaaaga 480
ttaaggagga aggaa 495
```

20 <210> 143

<211> 462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 143

	atgtacagga	tgcaactcct	gtcttgcatt	gcactaagtc	ttgcacttgt	cacaaacagt	60
	gcacctactt	caagttctac	aaagaaaaca	cagctacaac	tggagcattt	actgctggat	120
	ttacagatga	ttttgaatgg	aattaataat	tacaagaatc	ccaaactcac	caggatgctc	180
	acatttaagt	tttacatgcc	caagaaggcc	acagaactga	aacatcttca	gtgtctagaa	240
	gaagaactca	aacctctgga	ggaagtgcta	aatttagctc	aaagcaaaaa	ctttcactta	300
	agaccaggg	acttaatcag	caatatcaac	gtaatagttc	tggaaactaaa	gggatctgaa	360
	acaacattca	tgtgtgaata	tgctgatgag	acagcaacca	ttgtagaatt	tctgaacaga	420
	tggattacct	tttgtcaaag	catcatctca	acactgactt	ga		462
	<210> 144						
	<211> 462						
	<212> DNA						
5	<213> Homo sapiens						
	<400> 144						
	atgtacagga	tgcaactcct	gtcttgcatt	gcactaagtc	ttgcacttgt	cacaaacagt	60
	gcacctactt	caagttctac	aaagaaaaca	cagctacaac	tggagcattt	actgctggat	120
	ttacagatga	ttttgaatgg	aattaataat	tacaagaatc	ccaaactcac	caggatgctc	180
	acatttaagt	tttacatgcc	caagaaggcc	acagaactga	aacatcttca	gtgtctagaa	240
	gaagaactca	aacctctgga	ggaagtgcta	aatttagctc	aaagcaaaaa	ctttcactta	300
	agaccaggg	acttaatcag	caatatcaac	gtaatagttc	tggaaactaaa	gggatctgaa	360
	acaacattca	tgtgtgaata	tgctgatgag	acagcaacca	ttgtagaatt	tctgaacaga	420
	tggattacct	tttgtcaaag	catcatctca	acactgactt	ga		462
10	<210> 145						
	<211> 462						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<400> 145						
	atgtacagga	tgcaactcct	gtcttgcatt	gcactaagtc	ttgcacttgt	cacaaacagt	60
	gcacctactt	caagttctac	aaagaaaaca	cagctacaac	tggagcattt	actgctggat	120
	ttacagatga	ttttgaatgg	aattaataat	tacaagaatc	ccaaactcac	caggatgctc	180
	acatttaagt	tttacatgcc	caagaaggcc	acagaactga	aacatcttca	gtgtctagaa	240
	gaagaactca	aacctctgga	ggaagtgcta	aatttagctc	aaagcaaaaa	ctttcactta	300
	agaccaggg	acttaatcag	caatatcaac	gtaatagttc	tggaaactaaa	gggatctgaa	360
	acaacattca	tgtgtgaata	tgctgatgag	acagcaacca	ttgtagaatt	tctgaacaga	420
15	tggattacct	tttgtcaaag	catcatctca	acactgactt	ga		462
	<210> 146						
	<211> 462						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
20	<400> 146						
	atgtacagga	tgcaactcct	gtcttgcatt	gcactaagtc	ttgcacttgt	cacaaacagt	60
	gcacctactt	caagttctac	aaagaaaaca	cagctacaac	tggagcattt	actgctggat	120
	ttacagatga	ttttgaatgg	aattaataat	tacaagaatc	ccaaactcac	caggatgctc	180
	acatttaagt	tttacatgcc	caagaaggcc	acagaactga	aacatcttca	gtgtctagaa	240
	gaagaactca	aacctctgga	ggaagtgcta	aatttagctc	aaagcaaaaa	ctttcactta	300
	agaccaggg	acttaatcag	caatatcaac	gtaatagttc	tggaaactaaa	gggatctgaa	360
	acaacattca	tgtgtgaata	tgctgatgag	acagcaacca	ttgtagaatt	tctgaacaga	420
	tggattacct	tttgtcaaag	catcatctca	acactgactt	ga		462
	<210> 147						
	<211> 453						
	<212> DNA						
25	<213> Homo sapiens						
	<400> 147						
	atgcaactcc	tgtcttgcatt	tgcaactaagt	cttgcacttg	tcacaaacag	tgcaactact	60
	tcaagttctca	caaagaaaac	acagctacaa	ctggagcatt	tactgctgga	tttacagatg	120
	attttgaatg	gaatttaataa	ttacaagaat	ccaaactca	ccaggatgct	cacatttaag	180
	ttttacatgc	ccaagaaggc	cacagaactg	aaacatcttc	agtgtctaga	agaagaactc	240
	aaacctctgg	aggaagtgtc	aaatttagct	caaagcaaaa	actttcactt	aagaccagg	300
	gacttaatca	gcaatatcaa	cgtaatatgt	ctggaactaa	agggatctga	aacaacattc	360
	atgtgtgaat	atgctgatga	gacagcaacc	attgtagaat	ttctgaacag	atggattacc	420
	ttttctcaga	gcatcatctc	aacactgact	tga			453
	<210> 148						

<211> 453
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 148

```

atgcaactcc tgtcttgcac tgcactaagt cttgcacttg tcacaaacag tgcacctact      60
tcaagttcta caaagaaaac acagctacaa ctggagcatt tactgctgga tttacagatg      120
atgttgatg gaattaataa ttacaagaat cccaaactca ccaggatgct cacatttaag      180
ttttacatgc ccaagaaggc cacagaactg aaacatcttc agtgtctaga agaagaactc      240
aaacctctgg aggaagtgtc aaatttagct caaagcaaaa actttcactt aagaccagg      300
gacttaatca gcaatatcaa cgtaatagtt ctggaactaa agggatctga aacaacattc      360
atgtgtgaat atgctgatga gacagcaacc attgtagaat ttctgaacag atggattacc      420
5 tttctcaga gcatcatctc aacactgact tga                                     453

```

<210> 149
 <211> 767
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 149

```

Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Ser Leu Ala Asn
  1              5              10              15

Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly
      20              25              30

Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu
      35              40              45

Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr
      50              55              60

Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp
      65              70              75              80

Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr
      85              90              95

Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu
      100             105             110

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

Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe
      130             135             140

His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala
      145             150             155             160

Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys
      165             170             175

Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala
      180             185             190

Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala
      195             200             205

Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly
      210             215             220

Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe
      225             230             235             240

```

ES 2 567 634 T3

Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr
 245 250 255
 Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp
 260 265 270
 Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile
 275 280 285
 Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser
 290 295 300
 His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro
 305 310 315 320
 Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr
 325 330 335
 Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala
 340 345 350
 Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys
 355 360 365
 Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Asp Pro His
 370 375 380
 Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu
 385 390 395 400
 Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly
 405 410 415
 Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
 420 425 430
 Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly
 435 440 445
 Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro
 450 455 460
 Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu
 465 470 475 480
 His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu
 485 490 495
 Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu
 500 505 510
 Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala
 515 520 525
 Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr
 530 535 540
 Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln
 545 550 555 560
 Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys

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

<210> 150
<211> 769
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 150
Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
  1             5             10             15
Ile Ser Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp
      20             25             30
Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln
      35             40             45
Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu
      50             55             60
Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn
      65             70             75             80
Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val

```

ES 2 567 634 T3

85					90					95					
Ala	Thr	Leu	Arg 100	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu 105	Met	Ala	Asp	Cys	Cys 110	Ala	Lys
Gln	Glu	Pro 115	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys 120	Phe	Leu	Gln	His	Lys 125	Asp	Asp	Asn
Pro	Asn 130	Leu	Pro	Arg	Leu	Val 135	Arg	Pro	Glu	Val	Asp 140	Val	Met	Cys	Thr
Ala 145	Phe	His	Asp	Asn	Glu 150	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys 155	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu 160
Ile	Ala	Arg	Arg	His 165	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala 170	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe 175	Phe
Ala	Lys	Arg	Tyr 180	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr 185	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala 190	Ala	Asp
Lys	Ala 195	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys 200	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg 205	Asp	Glu	Gly
Lys 210	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln 215	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala 220	Ser	Leu	Gln	Lys
Phe 225	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe 230	Lys	Ala	Trp	Ala	Val 235	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln 240
Arg	Phe	Pro	Lys 245	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val 250	Ser	Lys	Leu	Val 255	Thr	Asp
Leu	Thr	Lys	Val 260	His	Thr	Glu	Cys	Cys 265	His	Gly	Asp	Leu	Leu 270	Glu	Cys
Ala	Asp	Asp 275	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala 280	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu 285	Asn	Gln	Asp
Ser 290	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys 295	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys 300	Pro	Leu	Leu	Glu
Lys 305	Ser	His	Cys	Ile	Ala 310	Glu	Val	Glu	Asn	Asp 315	Glu	Met	Pro	Ala	Asp 320
Leu	Pro	Ser	Leu	Ala 325	Ala	Asp	Phe	Val	Glu 330	Ser	Lys	Asp	Val	Cys 335	Lys
Asn	Tyr	Ala	Glu 340	Ala	Lys	Asp	Val	Phe 345	Leu	Gly	Met	Phe	Leu 350	Tyr	Glu
Tyr	Ala 355	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr 360	Ser	Val	Val	Leu	Leu 365	Leu	Arg	Leu
Ala 370	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr 375	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys 380	Ala	Ala	Ala	Asp
Pro 385	His	Glu	Cys	Tyr	Ala 390	Lys	Val	Phe	Asp	Glu 395	Phe	Lys	Pro	Leu	Val 400
Glu	Glu	Pro	Gln	Asn 405	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn 410	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu 415	Gln

Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys
 420 425 430
 Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn
 435 440 445
 Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg
 450 455 460
 Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys
 465 470 475 480
 Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys
 485 490 495
 Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val
 500 505 510
 Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe
 515 520 525
 His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys
 530 535 540
 Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys
 545 550 555 560
 Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys
 565 570 575
 Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys
 580 585 590
 Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Cys Asp Leu Pro
 595 600 605
 Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln
 610 615 620
 Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe
 625 630 635 640
 Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr
 645 650 655
 Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser
 660 665 670
 Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe
 675 680 685
 Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile
 690 695 700
 Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile
 705 710 715 720
 Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu
 725 730 735
 Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met
 740 745 750
 Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys
 755 760 765

Glu

<210> 151

<211> 779

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 567 634 T3

<400> 151

```

Met Asn Ile Phe Tyr Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly
 1          5          10          15

Leu Glu His Thr His Arg Arg Gly Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His
      20          25          30

Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe
      35          40          45

Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro
      50          55          60

Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys
      65          70          75          80

Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His
      85          90          95

Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr
      100          105          110

Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn
      115          120          125

Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu
      130          135          140

Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu
      145          150          155          160

Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro
      165          170          175

Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala
      180          185          190

Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu
      195          200          205

Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys
      210          215          220

Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe
      225          230          235          240

```

ES 2 567 634 T3

Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu
 245 250 255
 Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr
 260 265 270
 Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp
 275 280 285
 Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu
 290 295 300
 Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala
 305 310 315 320
 Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala
 325 330 335
 Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
 340 345 350
 Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro
 355 360 365
 Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr
 370 375 380
 Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala
 385 390 395 400
 Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu
 405 410 415
 Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
 420 425 430
 Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
 435 440 445
 Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser
 450 455 460
 Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
 465 470 475 480
 Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
 485 490 495
 Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn
 500 505 510
 Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro
 515 520 525
 Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr
 530 535 540
 Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu
 545 550 555 560
 Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val

ES 2 567 634 T3

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

<210> 152

<211> 774

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 152

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

ES 2 567 634 T3

65					70					75					80				
His	Glu	Met	Ile	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser				
				85					90					95					
Ser	Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Thr	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Tyr	Thr	Glu	Leu				
			100					105					110						
Tyr	Gln	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Ile	Gln	Gly	Val	Gly				
		115					120					125							
Val	Thr	Glu	Thr	Pro	Leu	Met	Lys	Glu	Asp	Ser	Ile	Leu	Ala	Val	Arg				
		130				135					140								
Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser				
145					150					155					160				
Pro	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg	Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Ser	Phe	Ser				
				165					170					175					
Leu	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Arg	Ser	Lys	Glu	Asp	Ala	His				
			180					185					190						
Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe				
		195					200					205							
Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro				
		210				215					220								
Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys				
225					230					235					240				
Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His				
				245					250					255					
Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr				
			260					265					270						
Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn				
		275					280					285							
Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu				
		290				295					300								
Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu				
305					310					315					320				
Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro				
				325					330					335					
Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala				
			340					345					350						
Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu				
		355					360					365							
Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys				
						37													

ES 2 567 634 T3

Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu
 405 410 415
 Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr
 420 425 430
 Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp
 435 440 445
 Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu
 450 455 460
 Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala
 465 470 475 480
 Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala
 485 490 495
 Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
 500 505 510
 Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro
 515 520 525
 Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr
 530 535 540
 Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala
 545 550 555 560
 Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu
 565 570 575
 Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
 580 585 590
 Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
 595 600 605
 Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser
 610 615 620
 Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
 625 630 635 640
 Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
 645 650 655
 Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn
 660 665 670
 Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro
 675 680 685
 Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr
 690 695 700
 Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu
 705 710 715 720
 Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val
 725 730 735
 Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp
 740 745 750
 Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser
 755 760 765
 Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 770

<210> 153

<211> 769

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

```

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1          5          10          15

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

Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys
      35          40          45

Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn
      50          55          60

Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln
      65          70          75          80

Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp
      85          90          95

Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn
      100          105          110

Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro
      115          120          125

Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg
      130          135          140

Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu
      145          150          155          160

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

Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
      180          185          190

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
      195          200          205

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
      210          215          220

```

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 225 230 235 240
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 245 250 255
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 260 265 270
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 275 280 285
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 290 295 300
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 305 310 315 320
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 325 330 335
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 340 345 350
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 355 360 365
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 370 375 380
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 385 390 395 400
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 405 410 415
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 420 425 430
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 435 440 445
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 450 455 460
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 465 470 475 480
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 485 490 495
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 500 505 510
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 515 520 525
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 530 535 540
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu

ES 2 567 634 T3

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

Leu

<210> 154

<211> 835

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 154

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

ES 2 567 634 T3

Phe	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Gly	Val	65	70	75	80
Ser	Leu	Asp	Lys	Arg	Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Thr	His	Ser	Leu	Gly	Ser	85	90	95	
Arg	Arg	Thr	Leu	Met	Leu	Leu	Ala	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Phe	100	105	110	
Ser	Cys	Leu	Lys	Asp	Arg	His	Asp	Phe	Gly	Phe	Pro	Gln	Glu	Glu	Phe	115	120	125	
Gly	Asn	Gln	Phe	Gln	Lys	Ala	Glu	Thr	Ile	Pro	Val	Leu	His	Glu	Met	130	135	140	
Ile	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser	Ala	Ala	145	150	155	160
Trp	Asp	Glu	Thr	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Tyr	Thr	Glu	Leu	Tyr	Gln	Gln	165	170	175	
Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Ile	Gln	Gly	Val	Gly	Val	Thr	Glu	180	185	190	
Thr	Pro	Leu	Met	Lys	Glu	Asp	Ser	Ile	Leu	Ala	Val	Arg	Lys	Tyr	Phe	195	200	205	
Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	Pro	Cys	Ala	210	215	220	
Trp	Glu	Val	Val	Arg	Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	225	230	235	240
Asn	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Arg	Ser	Lys	Glu	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	245	250	255	
Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	260	265	270	
Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	275	280	285	
His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	290	295	300	
Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	305	310	315	320
Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	325	330	335	
Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	340	345	350	
Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	355	360	365	
Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	370	375	380	

ES 2 567 634 T3

Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr
 385 390 395 400
 Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr
 405 410 415
 Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu
 420 425 430
 Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu
 435 440 445
 Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp
 450 455 460
 Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu
 465 470 475 480
 Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys
 485 490 495
 His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys
 500 505 510
 Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys
 515 520 525
 Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu
 530 535 540
 Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val
 545 550 555 560
 Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe
 565 570 575
 Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser
 580 585 590
 Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu
 595 600 605
 Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe
 610 615 620
 Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln
 625 630 635 640
 Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala
 645 650 655
 Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr
 660 665 670
 Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys
 675 680 685
 Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser
 690 695 700
 Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser

ES 2 567 634 T3

705 710 715 720
 Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro
 725 730 735
 Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe
 740 745 750
 Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu
 755 760 765
 Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys
 770 775 780
 His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp
 785 790 795 800
 Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr
 805 810 815
 Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala
 820 825 830
 Leu Gly Leu
 835

<210> 155

<211> 774

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 155

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

ES 2 567 634 T3

145		150		155		160
Lys Tyr Leu Tyr	Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro	165	170	175		
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys	180	185	190			
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu	195	200	205			
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys	210	215	220			
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val	225	230	235			240
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser	245	250	255			
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly	260	265	270			
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile	275	280	285			
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu	290	295	300			
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp	305	310	315			320
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser	325	330	335			
Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly	340	345	350			
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val	355	360	365			
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys	370	375	380			
Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu	385	390	395			400
Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys	405	410	415			
Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu	420	425	430			
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val	435	440	445			
Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His	450	455	460			
Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val	465	470	475			480

ES 2 567 634 T3

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
 610 615 620
 Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
 625 630 635 640
 Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
 645 650 655
 Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
 660 665 670
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
 675 680 685
 Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 690 695 700
 Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
 705 710 715 720
 Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 725 730 735
 Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 740 745 750
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
 755 760 765
 Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 770

<210> 156

<211> 773

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 156

ES 2 567 634 T3

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
 20 25 30
 Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
 35 40 45
 Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
 50 55 60
 Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
 65 70 75 80
 Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
 85 90 95
 Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
 100 105 110
 Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
 115 120 125
 Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
 130 135 140
 Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
 145 150 155 160
 Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
 165 170 175
 Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu Asp Ala His Lys
 180 185 190
 Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys
 195 200 205
 Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe
 210 215 220
 Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr
 225 230 235 240
 Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr
 245 250 255
 Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr
 260 265 270
 Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu
 275 280 285
 Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val
 290 295 300

Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu
 305 310 315 320
 Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr
 325 330 335
 Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala
 340 345 350
 Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro
 355 360 365
 Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln
 370 375 380
 Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys
 385 390 395 400
 Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe
 405 410 415
 Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu
 420 425 430
 Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu
 435 440 445
 Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys
 450 455 460
 Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu
 465 470 475 480
 Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp
 485 490 495
 Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp
 500 505 510
 Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp
 515 520 525
 Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr
 530 535 540
 Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys
 545 550 555 560
 Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile
 565 570 575
 Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln
 580 585 590
 Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr
 595 600 605
 Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys
 610 615 620
 Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr

625 630 635 640
 Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro
 645 650 655
 Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg
 660 665 670
 Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys
 675 680 685
 Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu
 690 695 700
 Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu
 705 710 715 720
 Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met
 725 730 735
 Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys
 740 745 750
 Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln
 755 760 765
 Ala Ala Leu Gly Leu
 770

<210> 157

<211> 769

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 157

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

ES 2 567 634 T3

130					135					140				
Ile Thr Leu Tyr	Leu Lys Glu Lys Lys Tyr	Ser Pro Cys Ala Trp Glu	145	150	155	160								
Val Val Arg Ala	Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser	Leu Ser Thr Asn Leu	165	170	175									
Gln Glu Ser Leu	Arg Ser Lys Glu Asp Ala His Lys Ser	Glu Val Ala	180	185	190									
His Arg Phe Lys	Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys	Ala Leu Val Leu	195	200	205									
Ile Ala Phe Ala	Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp	His Val	210	215	220									
Lys Leu Val Asn	Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val	Ala Asp	225	230	235	240								
Glu Ser Ala Glu	Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe	Gly Asp	245	250	255									
Lys Leu Cys Thr	Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu	Met Ala	260	265	270									
Asp Cys Cys Ala	Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe	Leu Gln	275	280	285									
His Lys Asp Asp	Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro	Glu Val	290	295	300									
Asp Val Met Cys	Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe	Leu Lys	305	310	315	320								
Lys Tyr Leu Tyr	Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr	Ala Pro	325	330	335									
Glu Leu Leu Phe	Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr	Glu Cys	340	345	350									
Cys Gln Ala Ala	Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu	Asp Glu	355	360	365									
Leu Arg Asp Glu	Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu	Lys Cys	370	375	380									
Ala Ser Leu Gln	Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp	Ala Val	385	390	395	400								
Ala Arg Leu Ser	Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu	Val Ser	405	410	415									
Lys Leu Val Thr	Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys	His Gly	420	425	430									
Asp Leu Leu Glu	Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys	Tyr Ile	435	440	445									
Cys Glu Asn Gln	Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys	Cys Glu	450	455	460									

ES 2 567 634 T3

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 465 470 475 480
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 485 490 495
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 500 505 510
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 515 520 525
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 530 535 540
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 545 550 555 560
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 565 570 575
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 580 585 590
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 595 600 605
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 610 615 620
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 625 630 635 640
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 645 650 655
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 660 665 670
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 675 680 685
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 690 695 700
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 705 710 715 720
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 725 730 735
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 740 745 750
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 755 760 765

Leu

<210> 158

<211> 774

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 158

ES 2 567 634 T3

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu

ES 2 567 634 T3

290					295					300					
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp
305					310					315					320
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly
			340					345					350		
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val
		355					360					365			
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
		370					375					380			
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu
385					390					395					400
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys
				405					410					415	
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu
			420					425					430		
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val
		435					440					445			
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His
		450				455					460				
Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val
465					470					475					480
Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg
				485					490					495	
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe
			500					505					510		
Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala
		515					520					525			
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu
		530				535					540				
Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys
545					550					555					560
Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala
				565					570					575	
Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe
			580					585					590		
Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly
		595					600					605			
Leu	Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Thr	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Arg	Arg	Thr	Leu
		610				615					620				

ES 2 567 634 T3

Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
625 630 635 640

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
645 650 655

Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
660 665 670

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
675 680 685

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
690 695 700

Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
705 710 715 720

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770

<210> 159

<211> 775

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 159

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe
20 25 30

Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu
35 40 45

Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile
50 55 60

Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala
65 70 75 80

Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln
85 90 95

Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu
100 105 110

Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu
115 120 125

Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu
 130 135 140
 His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg
 165 170 175
 Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Asp Ala
 180 185 190
 His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn
 195 200 205
 Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys
 210 215 220
 Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala
 225 230 235 240
 Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu
 245 250 255
 His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu
 260 265 270
 Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg
 275 280 285
 Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg
 290 295 300
 Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn
 305 310 315 320
 Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His
 325 330 335
 Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys
 340 345 350
 Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu
 355 360 365
 Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala
 370 375 380
 Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala
 385 390 395 400
 Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala
 405 410 415
 Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His
 420 425 430
 Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala
 435 440 445

ES 2 567 634 T3

Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys
 450 455 460
 Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile
 465 470 475 480
 Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala
 485 490 495
 Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala
 500 505 510
 Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His
 515 520 525
 Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu
 530 535 540
 Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr
 545 550 555 560
 Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn
 565 570 575
 Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys
 580 585 590
 Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
 595 600 605
 Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly
 610 615 620
 Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu
 625 630 635 640
 Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys
 645 650 655
 Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val
 660 665 670
 Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val
 675 680 685
 Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys
 690 695 700
 Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val
 705 710 715 720
 Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala
 725 730 735
 Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp
 740 745 750
 Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
 755 760 765
 Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

770

775

<210> 160

<211> 775

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 160

ES 2 567 634 T3

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile

ES 2 567 634 T3

275					280					285					
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu
290						295					300				
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp
305					310					315					320
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly
			340					345					350		
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val
	355						360					365			
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
	370					375					380				
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu
385					390					395					400
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys
			405					410						415	
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu
			420				425						430		
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val
	435						440					445			
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His
	450					455					460				
Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val
465					470					475					480
Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg
			485						490					495	
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe
		500						505					510		
Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala
	515						520					525			
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu
	530					535					540				
Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys
545					550					555					560
Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala
			565						570					575	
Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe
		580						585				590			
Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly
	595					600						605			

ES 2 567 634 T3

Leu Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
 610 615 620
 Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys
 625 630 635 640
 Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
 645 650 655
 Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
 660 665 670
 Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
 675 680 685
 Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
 690 695 700
 Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
 705 710 715 720
 Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
 725 730 735
 Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
 740 745 750
 Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
 755 760 765
 Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 770 775

<210> 161

<211> 772

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 161

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15
 Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20 25 30
 Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35 40 45
 Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50 55 60
 Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 100 105 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115 120 125
 Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 130 135 140
 Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160
 His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175
 Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Asp Ala His Lys Ser
 180 185 190
 Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala
 195 200 205
 Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu
 210 215 220
 Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys
 225 230 235 240
 Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu
 245 250 255
 Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys
 275 280 285
 Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg
 290 295 300
 Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr
 305 310 315 320
 Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe
 325 330 335
 Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe
 340 345 350
 Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys
 355 360 365
 Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg
 370 375 380
 Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala
 385 390 395 400
 Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala
 405 410 415
 Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys
 420 425 430

ES 2 567 634 T3

Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala
 435 440 445
 Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu
 450 455 460
 Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val
 465 470 475 480
 Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe
 485 490 495
 Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val
 500 505 510
 Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr
 515 520 525
 Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu
 530 535 540
 Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val
 545 550 555 560
 Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys
 565 570 575
 Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn
 580 585 590
 Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro
 595 600 605
 Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys
 610 615 620
 Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu
 625 630 635 640
 Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val
 645 650 655
 Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg
 660 665 670
 Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu
 675 680 685
 Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser
 690 695 700
 Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val
 705 710 715 720
 Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp
 725 730 735
 Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu
 740 745 750
 Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala
 755 760 765
 Ala Leu Gly Leu
 770

<210> 162
 <211> 775
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 162

ES 2 567 634 T3

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

ES 2 567 634 T3

260						265						270					
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile		
		275					280					285					
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu		
	290					295					300						
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp		
305					310					315					320		
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser		
				325					330					335			
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly		
			340					345					350				
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val		
		355					360					365					
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys		
	370					375					380						
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu		
385					390					395					400		
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys		
				405					410					415			
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu		
			420					425					430				
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val		
		435					440					445					
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His		
	450					455					460						
Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val		
465					470					475					480		
Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg		
				485					490					495			
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe		
			500					505					510				
Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala		
		515					520					525					
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu		
	530					535					540						
Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys		
545					550					555					560		
Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala		
				565					570					575			
Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe		
			580					585					590				

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
610 615 620

Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys
625 630 635 640

Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
645 650 655

Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
660 665 670

Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
675 680 685

Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
690 695 700

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
705 710 715 720

Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
725 730 735

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
740 745 750

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
755 760 765

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
770 775

<210> 163

<211> 772

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (240)

<223> Xaa es igual a cualquiera de los L-aminoácidos de origen natural

10 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (270)

<223> Xaa es igual a cualquiera de los L-aminoácidos de origen natural

<400> 163

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
20 25 30

15 Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg

ES 2 567 634 T3

35					40					45					
Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu
50						55					60				
Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Gln	Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile
65					70					75					80
Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser
				85					90					95	
Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val
			100					105					110		
Tyr	His	Gln	Ile	Asn	His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Glu
	115						120					125			
Lys	Glu	Asp	Phe	Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys
	130					135					140				
Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg	Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser
145					150					155					160
His	Cys	Ala	Trp	Thr	Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr
				165					170					175	
Phe	Ile	Asn	Arg	Leu	Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn	Asp	Ala	His	Lys	Ser
			180					185					190		
Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala
	195					200						205			
Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu
	210					215					220				
Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Xaa
225					230					235					240
Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu
				245					250					255	
Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Xaa	Tyr	Gly
			260					265					270		
Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys
	275						280					285			
Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg
	290					295					300				
Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr
305					310					315					320
Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe
				325					330					335	
Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe
			340					345					350		
Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys
	355						360					365			

Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg
 370 375 380
 Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala
 385 390 395 400
 Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala
 405 410 415
 Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys
 420 425 430
 Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala
 435 440 445
 Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu
 450 455 460
 Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val
 465 470 475 480
 Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe
 485 490 495
 Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val
 500 505 510
 Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr
 515 520 525
 Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu
 530 535 540
 Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val
 545 550 555 560
 Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys
 565 570 575
 Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn
 580 585 590
 Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro
 595 600 605
 Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys
 610 615 620
 Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu
 625 630 635 640
 Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val
 645 650 655
 Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg
 660 665 670
 Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu
 675 680 685

Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser
690 695 700
Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val
705 710 715 720
Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp
725 730 735
Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu
740 745 750
Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala
755 760 765
Ala Leu Gly Leu
770

<210> 164

<211> 775

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (487)

<223> Xaa es igual a cualquiera de los L-aminoácidos de origen natural

10 <400> 164

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

ES 2 567 634 T3

165										170					175						
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys						
			180					185					190								
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu						
		195					200					205									
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys						
	210					215					220										
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val						
225					230					235					240						
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser						
				245					250					255							
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly						
			260					265					270								
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile						
	275						280					285									
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu						
	290					295					300										
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp						
305					310					315					320						
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser						
				325					330					335							
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly						
			340					345					350								
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val						
	355						360					365									
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys						
	370					375					380										
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu						
385					390					395					400						
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys						
				405					410					415							
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu						
			420					425					430								
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val						

ES 2 567 634 T3

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
 610 615 620
 Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys
 625 630 635 640
 Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
 645 650 655
 Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
 660 665 670
 Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
 675 680 685
 Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
 690 695 700
 Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
 705 710 715 720
 Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
 725 730 735
 Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
 740 745 750
 Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
 755 760 765
 Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 770 775

<210> 165

<211> 771

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 165

Met	Thr	Asn	Lys	Cys	Leu	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Phe	Ser	1	5	10	15
Thr	Thr	Ala	Leu	Ser	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	20	25	30	
Ser	Asn	Phe	Gln	Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	35	40	45	
Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	50	55	60	
Lys	Gln	Leu	Gln	Gln	Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	65	70	75	80
Glu	Met	Leu	Gln	Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	85	90	95	
Thr	Gly	Trp	Asn	Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	100	105	110	
His	Gln	Ile	Asn	His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	115	120	125	
Glu	Asp	Phe	Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys	Arg	130	135	140	
Tyr	Tyr	Gly	Arg	Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	145	150	155	160
Cys	Ala	Trp	Thr	Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	165	170	175	
Ile	Asn	Arg	Leu	Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	180	185	190	
Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	195	200	205	
Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	210	215	220	
His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	225	230	235	240
Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	245	250	255	
Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	260	265	270	
Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	275	280	285	
Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	290	295	300	
Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	305	310	315	320

ES 2 567 634 T3

Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr
 325 330 335
 Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr
 340 345 350
 Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu
 355 360 365
 Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu
 370 375 380
 Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp
 385 390 395 400
 Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu
 405 410 415
 Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys
 420 425 430
 His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys
 435 440 445
 Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys
 450 455 460
 Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu
 465 470 475 480
 Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val
 485 490 495
 Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe
 500 505 510
 Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser
 515 520 525
 Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu
 530 535 540
 Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe
 545 550 555 560
 Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln
 565 570 575
 Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala
 580 585 590
 Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr
 595 600 605
 Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys
 610 615 620
 Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser
 625 630 635 640
 Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser

ES 2 567 634 T3

645										650					655				
Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro				
660								665				670							
Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe				
675								680				685							
Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu				
690								695				700							
Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys				
705				710				715				720							
His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp				
				725				730				735							
Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr				
				740				745				750							
Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala				
755				760				765											
Leu	Gly	Leu																	
770																			

<210> 166

<211> 771

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 166

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

ES 2 567 634 T3

145		150		155		160
Cys Ala Trp Thr	Ile Val Arg Val	Glu Ile Leu Arg	Asn Phe Tyr Phe			
	165		170		175	
Ile Asn Arg Leu Thr	Gly Tyr Leu Arg	Asn Asp Ala His	Lys Ser Glu			
	180	185	190			
Val Ala His Arg Phe	Lys Asp Leu Gly	Glu Glu Asn Phe	Lys Ala Leu			
	195	200	205			
Val Leu Ile Ala Phe	Ala Gln Tyr Leu	Gln Gln Cys Pro	Phe Glu Asp			
	210	215	220			
His Val Lys Leu Val	Asn Glu Val Thr	Glu Phe Ala Lys	Thr Cys Val			
	225	230	235		240	
Ala Asp Glu Ser Ala	Glu Asn Cys Asp	Lys Ser Leu His	Thr Leu Phe			
	245	250	255			
Gly Asp Lys Leu Cys	Thr Val Ala Thr	Leu Arg Glu Thr	Tyr Gly Glu			
	260	265	270			
Met Ala Asp Cys Cys	Ala Lys Gln Glu	Pro Glu Arg Asn	Glu Cys Phe			
	275	280	285			
Leu Gln His Lys Asp	Asp Asn Pro Asn	Leu Pro Arg Leu	Val Arg Pro			
	290	295	300			
Glu Val Asp Val Met	Cys Thr Ala Phe	His Asp Asn Glu	Glu Thr Phe			
	305	310	315		320	
Leu Lys Lys Tyr Leu	Tyr Glu Ile Ala	Arg Arg His Pro	Tyr Phe Tyr			
	325	330	335			
Ala Pro Glu Leu Leu	Phe Phe Ala Lys	Arg Tyr Lys Ala	Ala Phe Thr			
	340	345	350			
Glu Cys Cys Gln Ala	Ala Asp Lys Ala	Ala Cys Leu Leu	Pro Lys Leu			
	355	360	365			
Asp Glu Leu Arg Asp	Glu Gly Lys Ala	Ser Ser Ala Lys	Gln Arg Leu			
	370	375	380			
Lys Cys Ala Ser Leu	Gln Lys Phe Gly	Glu Arg Ala Phe	Lys Ala Trp			
	385	390	395		400	
Ala Val Ala Arg Leu	Ser Gln Arg Phe	Pro Lys Ala Glu	Phe Ala Glu			
	405	410	415			
Val Ser Lys Leu Val	Thr Asp Leu Thr	Lys Val His Thr	Glu Cys Cys			
	420	425	430			
His Gly Asp Leu Leu	Glu Cys Ala Asp	Asp Arg Ala Asp	Leu Ala Lys			
	435	440	445			
Tyr Ile Cys Glu Asn	Gln Asp Ser Ile	Ser Ser Lys Leu	Lys Glu Cys			
	450	455	460			
Cys Glu Lys Pro Leu	Leu Glu Lys Ser	His Cys Ile Ala	Glu Val Glu			
	465	470	475		480	

ES 2 567 634 T3

Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val
 485 490 495
 Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe
 500 505 510
 Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser
 515 520 525
 Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu
 530 535 540
 Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe
 545 550 555 560
 Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln
 565 570 575
 Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala
 580 585 590
 Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr
 595 600 605
 Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys
 610 615 620
 Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser
 625 630 635 640
 Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser
 645 650 655
 Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro
 660 665 670
 Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe
 675 680 685
 Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu
 690 695 700
 Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys
 705 710 715 720
 His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp
 725 730 735
 Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr
 740 745 750
 Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala
 755 760 765
 Leu Gly Leu
 770

<210> 167

<211> 769

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 167

ES 2 567 634 T3

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ala Gly Val
1 5 10 15

Ser Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
20 25 30

Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
35 40 45

Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val
50 55 60

Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
65 70 75 80

Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
85 90 95

Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
100 105 110

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

Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
130 135 140

Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
145 150 155 160

Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
165 170 175

Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
180 185 190

Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys
195 200 205

Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe
210 215 220

Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
225 230 235 240

Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu
245 250 255

Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala
260 265 270

Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser
275 280 285

Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys
290 295 300

ES 2 567 634 T3

Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn
 325 330 335
 Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr
 340 345 350
 Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala
 355 360 365
 Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro
 370 375 380
 His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu
 385 390 395 400
 Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu
 405 410 415
 Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
 420 425 430
 Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu
 435 440 445
 Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
 450 455 460
 Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val
 465 470 475 480
 Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
 485 490 495
 Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
 500 505 510
 Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
 515 520 525
 Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
 530 535 540
 Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu
 545 550 555 560
 Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
 565 570 575
 Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
 580 585 590
 Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Met Ser Tyr Asn Leu
 595 600 605
 Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu
 610 615 620
 Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn

ES 2 567 634 T3

625 630 635 640
 Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu
 645 650 655
 Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile
 660 665 670
 Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu
 675 680 685
 Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val
 690 695 700
 Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met
 705 710 715 720
 Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu
 725 730 735
 Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu
 740 745 750
 Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg
 755 760 765

Asn

<210> 168

<211> 769

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 168

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

ES 2 567 634 T3

Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
 145 150 155 160
 Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
 165 170 175
 Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
 180 185 190
 Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys
 195 200 205
 Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe
 210 215 220
 Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
 225 230 235 240
 Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu
 245 250 255
 Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala
 260 265 270
 Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser
 275 280 285
 Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys
 290 295 300
 Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn
 325 330 335
 Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr
 340 345 350
 Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala
 355 360 365
 Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro
 370 375 380
 His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu
 385 390 395 400
 Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu
 405 410 415
 Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
 420 425 430
 Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu
 435 440 445
 Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
 450 455 460

Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val
 465 470 475 480
 Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
 485 490 495
 Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
 500 505 510
 Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
 515 520 525
 Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
 530 535 540
 Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu
 545 550 555 560
 Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
 565 570 575
 Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
 580 585 590
 Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Met Ser Tyr Asn Leu
 595 600 605
 Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu
 610 615 620
 Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn
 625 630 635 640
 Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu
 645 650 655
 Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile
 660 665 670
 Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu
 675 680 685
 Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val
 690 695 700
 Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met
 705 710 715 720
 Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu
 725 730 735
 Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu
 740 745 750
 Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg
 755 760 765

Asn

<210> 169

<211> 769

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 169

ES 2 567 634 T3

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Gly Val
1 5 10 15

Ser Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
20 25 30

Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
35 40 45

Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val
50 55 60

Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
65 70 75 80

Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
85 90 95

Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
100 105 110

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

Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
130 135 140

Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
145 150 155 160

Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
165 170 175

Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
180 185 190

Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys
195 200 205

Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe
210 215 220

Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
225 230 235 240

Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu
245 250 255

Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala
260 265 270

Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser
275 280 285

Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys
290 295 300

ES 2 567 634 T3

Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn
 325 330 335
 Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr
 340 345 350
 Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala
 355 360 365
 Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro
 370 375 380
 His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu
 385 390 395 400
 Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu
 405 410 415
 Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
 420 425 430
 Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu
 435 440 445
 Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
 450 455 460
 Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val
 465 470 475 480
 Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
 485 490 495
 Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
 500 505 510
 Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
 515 520 525
 Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
 530 535 540
 Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu
 545 550 555 560
 Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
 565 570 575
 Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
 580 585 590
 Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Met Ser Tyr Asn Leu
 595 600 605
 Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu
 610 615 620

ES 2 567 634 T3

Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn
 625 630 635 640
 Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu
 645 650 655
 Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile
 660 665 670
 Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu
 675 680 685
 Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val
 690 695 700
 Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met
 705 710 715 720
 Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu
 725 730 735
 Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu
 740 745 750
 Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg
 755 760 765

Asn

<210> 170

<211> 774

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 170

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

ES 2 567 634 T3

130					135					140					
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys
145					150					155					160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro
				165					170					175	
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys
			180					185					190		
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu
		195					200					205			
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys
	210					215					220				
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val
225						230					235				240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser
				245					250					255	
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly
			260					265					270		
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile
	275						280					285			
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu
	290					295					300				
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp
305						310					315				320
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly
			340					345					350		
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val
	355					360					365				
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
	370					375					380				
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu
385						390					395				400
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys
				405				410						415	
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu
		420					425						430		
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val
	435					440						445			
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His
	450					455					460				

ES 2 567 634 T3

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
 610 615 620
 Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
 625 630 635 640
 Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
 645 650 655
 Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
 660 665 670
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
 675 680 685
 Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 690 695 700
 Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Glu Arg Val Gly Glu Thr Pro Leu Met
 705 710 715 720
 Asn Ala Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr
 725 730 735
 Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 740 745 750
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
 755 760 765
 Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 770

<210> 171

<211> 774

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 171

ES 2 567 634 T3

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30
His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45
Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60
Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80
Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
180 185 190
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
195 200 205
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
210 215 220
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu

ES 2 567 634 T3

610 615 620
 Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
 625 630 635 640
 Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
 645 650 655
 Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
 660 665 670
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
 675 680 685
 Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 690 695 700
 Glu Ser Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Ile Glu Ser Pro Leu Met
 705 710 715 720
 Tyr Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 725 730 735
 Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Ser Cys Ala Trp Glu Val Val
 740 745 750
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ile Asn Leu Gln Lys
 755 760 765
 Arg Leu Lys Ser Lys Glu
 770

<210> 172

<211> 774

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 172

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

ES 2 567 634 T3

115	120	125
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val 130 135 140		
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys 145 150 155 160		
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro 165 170 175		
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys 180 185 190		
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu 195 200 205		
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys 210 215 220		
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val 225 230 235 240		
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser 245 250 255		
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly 260 265 270		
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile 275 280 285		
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu 290 295 300		
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp 305 310 315 320		
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser 325 330 335		
Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly 340 345 350		
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val 355 360 365		
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys 370 375 380		
Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu 385 390 395 400		
Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys 405 410 415		
Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu 420 425 430		
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val 435 440 445		

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
 610 615 620
 Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
 625 630 635 640
 Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
 645 650 655
 Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
 660 665 670
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
 675 680 685
 Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Met
 690 695 700
 Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
 705 710 715 720
 Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 725 730 735
 Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 740 745 750
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Lys Ile Phe Gln Glu
 755 760 765
 Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 770

<210> 173

<211> 774

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 173

ES 2 567 634 T3

Met	Lys	Trp	Val	Ser	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	1	5	10	15
Tyr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Lys	Arg	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	20	25	30	
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	35	40	45		
Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	50	55	60	
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	65	70	75	80
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	85	90	95	
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	100	105	110	
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	115	120	125	
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	130	135	140	
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	145	150	155	160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	165	170	175	
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	180	185	190	
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	195	200	205	
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	210	215	220	
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	225	230	235	240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	245	250	255	
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	260	265	270	

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly

ES 2 567 634 T3

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

<210> 174

<211> 774

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 174

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala

ES 2 567 634 T3

100	105	110
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln		
115	120	125
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val		
130	135	140
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys		
145	150	155
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro		
165	170	175
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys		
180	185	190
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu		
195	200	205
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys		
210	215	220
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val		
225	230	235
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser		
245	250	255
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly		
260	265	270
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile		
275	280	285
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu		
290	295	300
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp		
305	310	315
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser		
325	330	335
Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly		
340	345	350
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val		
355	360	365
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys		
370	375	380
Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu		
385	390	395
Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys		
405	410	415
Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu		
420	425	430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
610 615 620

Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
625 630 635 640

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
645 650 655

Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
660 665 670

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
675 680 685

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
690 695 700

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Glu Arg Val Gly Glu Thr Pro Leu Met
705 710 715 720

Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Arg Leu Arg Arg Lys Glu
770

<210> 175
<211> 742
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 175

ES 2 567 634 T3

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

Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu
 260 265 270
 Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu
 275 280 285
 Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro
 290 295 300
 Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala
 305 310 315 320
 Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu
 325 330 335
 Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys
 340 345 350
 Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe
 355 360 365
 Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu
 370 375 380
 Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr
 385 390 395 400
 Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp
 405 410 415
 Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu
 420 425 430
 Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala
 435 440 445
 Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala
 450 455 460
 Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
 465 470 475 480
 Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro
 485 490 495
 Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr
 500 505 510
 Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala
 515 520 525
 Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu
 530 535 540
 Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
 545 550 555 560
 Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
 565 570 575
 Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser

ES 2 567 634 T3

580										585					590						
Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp						
	595						600					605									
Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr						
	610					615					620										
Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn						
625					630					635					640						
Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro						
				645					650					655							
Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr						
			660					665					670								
Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu						
	675						680					685									
Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val						
	690					695					700										
Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp						
705					710					715					720						
Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser						
				725				730						735							
Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu																
			740																		

<210> 176

<211> 742

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 176

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

ES 2 567 634 T3

115	120	125
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val 130 135 140		
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys 145 150 155 160		
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro 165 170 175		
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys 180 185 190		
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu 195 200 205		
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys 210 215 220		
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val 225 230 235 240		
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser 245 250 255		
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly 260 265 270		
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile 275 280 285		
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu 290 295 300		
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp 305 310 315 320		
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser 325 330 335		
Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly 340 345 350		
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val 355 360 365		
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys 370 375 380		
Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu 385 390 395 400		
Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys 405 410 415		
Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu 420 425 430		
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val 435 440 445		

ES 2 567 634 T3

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 610 615 620
 His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
 625 630 635 640
 Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
 645 650 655
 Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 660 665 670
 Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 675 680 685
 Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 690 695 700
 Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 705 710 715 720
 Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser
 725 730 735
 Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 740

<210> 177

<211> 742

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 177

ES 2 567 634 T3

Met	Lys	Trp	Val	Ser	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	1	5	10	15
Tyr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Lys	Arg	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	20	25	30	
Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	35	40	45	
Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	50	55	60	
Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	65	70	75	80
Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	85	90	95	
Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	100	105	110	
Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	115	120	125	
Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	130	135	140	
Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Asp	Ala	His	145	150	155	160
Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	165	170	175	
Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	180	185	190	
Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	195	200	205	
Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	210	215	220	
Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	225	230	235	240
Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	245	250	255	
Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	260	265	270	
Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	275	280	285	
Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	290	295	300	

ES 2 567 634 T3

Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala
 305 310 315 320
 Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu
 325 330 335
 Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys
 340 345 350
 Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe
 355 360 365
 Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu
 370 375 380
 Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr
 385 390 395 400
 Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp
 405 410 415
 Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu
 420 425 430
 Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala
 435 440 445
 Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala
 450 455 460
 Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
 465 470 475 480
 Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro
 485 490 495
 Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr
 500 505 510
 Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala
 515 520 525
 Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu
 530 535 540
 Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
 545 550 555 560
 Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
 565 570 575
 Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser
 580 585 590
 Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
 595 600 605
 Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
 610 615 620
 Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn

625 630 635 640
 Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro
 645 650 655
 Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr
 660 665 670
 Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu
 675 680 685
 Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val
 690 695 700
 Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp
 705 710 715 720
 Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser
 725 730 735
 Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 740

<210> 178

<211> 742

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 178

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

165										170				175			
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys		
			180					185					190				
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu		
		195					200					205					
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys		
	210					215					220						
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val		
225					230					235					240		
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser		
				245					250					255			
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly		
			260					265					270				
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile		
	275						280					285					
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu		
	290					295					300						
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp		
305					310					315					320		
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser		
				325					330					335			
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly		
			340					345					350				
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val		
	355						360					365					
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys		
	370					375					380						
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu		
385					390					395					400		
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys		
				405					410					415			
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu		
			420					425					430				
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val		
	435						440					445					
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His		
	450					455					460						
Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val		
465					470					475					480		
Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg		
				485					490					495			

ES 2 567 634 T3

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
610 615 620

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
625 630 635 640

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
645 650 655

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
660 665 670

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
675 680 685

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
690 695 700

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
705 710 715 720

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
725 730 735

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
740

<210> 179

<211> 738

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 179

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

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

ES 2 567 634 T3

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Asp Ala His Lys Ser Glu Val
145 150 155 160

Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val
165 170 175

Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His
180 185 190

Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala
195 200 205

Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly
210 215 220

Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met
225 230 235 240

Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu
245 250 255

Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu
260 265 270

Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu
275 280 285

Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala
290 295 300

Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu
305 310 315 320

Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp
325 330 335

Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys
340 345 350

Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala
 355 360 365
 Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val
 370 375 380
 Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His
 385 390 395 400
 Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr
 405 410 415
 Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys
 420 425 430
 Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn
 435 440 445
 Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu
 450 455 460
 Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu
 465 470 475 480
 Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val
 485 490 495
 Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys
 500 505 510
 Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp
 515 520 525
 Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn
 530 535 540
 Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu
 545 550 555 560
 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 565 570 575
 Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys
 580 585 590
 His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val
 595 600 605
 Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp
 610 615 620
 Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys
 625 630 635 640
 Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn
 645 650 655
 Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys
 660 665 670
 Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His

ES 2 567 634 T3

675 680 685
 Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe
 690 695 700
 Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys
 705 710 715 720
 Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu
 725 730 735

Gly Leu

<210> 180

<211> 738

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 180

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

ES 2 567 634 T3

Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	225	230	235	240
Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	245	250	255	
Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	260	265	270	
Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	275	280	285	
Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	290	295	300	
Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	305	310	315	320
Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	325	330	335	
Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	340	345	350	
Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	355	360	365	
Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	370	375	380	
Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	385	390	395	400
Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	405	410	415	
Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	420	425	430	
Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	435	440	445	
Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	450	455	460	
Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	465	470	475	480
Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	485	490	495	
Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	500	505	510	
Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	515	520	525	
Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	530	535	540	

ES 2 567 634 T3

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

Gly Leu

<210> 181

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 181

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

ES 2 567 634 T3

85 90 95
 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Lys Glu
 165
 <210> 182
 <211> 165
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 182
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45
 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60
 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95
 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Lys Glu
 165
 <210> 183
 <211> 165
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 183

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

<210> 184

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 184

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

<210> 185
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

<210> 186
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 186
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

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

<210> 187

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 187

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

10 <210> 188

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 188

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
 165

5

<210> 189

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 189

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

10

ES 2 567 634 T3

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

<210> 190

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 190

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

10 <210> 191

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 191

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

<210> 192

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 192

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

<210> 193
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 193
 Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15
 Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20 25 30
 Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35 40 45
 Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50 55 60
 Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 100 105 110
 Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115 120 125
 Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 130 135 140
 Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160
 His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175
 Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 180 185

10 <210> 194
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 194

ES 2 567 634 T3

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

<210> 195

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 195

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15
 Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg

ES 2 567 634 T3

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

<210> 196

<211> 166

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 196

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

10 <210> 197

<211> 187
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 197

```

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1          5          10          15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20          25          30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35          40          45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50          55          60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65          70          75          80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85          90          95

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
100          105          110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
115          120          125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
130          135          140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
145          150          155          160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
165          170          175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
180          185
    
```

5

<210> 198
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 198

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

<210> 199

<211> 166

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 199

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

<210> 200
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 200
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 201
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 201

ES 2 567 634 T3

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

<210> 202

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 202

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

10 <210> 203

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

```

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1          5          10          15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20          25          30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35          40          45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50          55          60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65          70          75          80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85          90          95

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

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115          120          125

Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Ser Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130          135          140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ile Asn Leu Gln Lys Arg
145          150          155          160

Leu Lys Ser Lys Glu
5          165

```

<210> 204

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

```

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

```

ES 2 567 634 T3

```

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

```

<210> 205

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 205

```

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

```

10 <210> 206

<211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 206

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

5

<210> 207
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 207

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

10

<210> 208
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 208
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125
 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 145 150

<210> 209
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 209
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125
 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 145 150

15 <210> 210

<211> 153
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 210

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

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
          20           25           30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
      35           40           45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
      50           55           60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
5  65           70           75           80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
          85           90           95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
          100          105          110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
      115           120           125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
      130           135           140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145           150
```

<210> 211
<211> 153
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 211

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

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
          20           25           30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
      35           40           45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
      50           55           60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 65           70           75           80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
          85           90           95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
          100          105          110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
      115           120           125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
      130           135           140

Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145           150
```

<210> 212
<211> 153

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 212
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

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

<210> 213
<211> 20
<212> DNA
10 <213> Homo sapiens

<400> 213
catacaaaact taagagtcca 20

<210> 214
<211> 56
15 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 214
ctttaaatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcagc gtagccaaa gaagca 56

<210> 215
<211> 20
20 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 215
catacaaaact taagagtcca 20

<210> 216
<211> 56
25 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 216
30 ctttaaatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatctgc cgatatatttg gctgca 56

<210> 217
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 217
 catacaaaact taagagtcca 20

 <210> 218
 <211> 56
 5 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 218
 ctttaaactcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatctct cttatccaaa gaacct 56

 <210> 219
 10 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 219
 cgcgcgctgc gacaaaagat gtgatctgcc tcaaaccac a 41
 15 <210> 220
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 220
 20 gcgcatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcttc ctactctt aaactttct 59

 <210> 221
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 221
 gttagcagag tagcagggt ttcggct 27

 <210> 222
 <211> 59
 <212> DNA
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 222
 gcgcatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcttc ctactctt aaactttct 59

 <210> 223
 <211> 41
 35 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 223
 cgcgcgctgc gacaaaagat gtgatctgcc tcaaaccac a 41

 <210> 224
 40 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 224
 gcgcatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcttc ctactctt aaactttct 59
 45 <210> 225
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 225
 50 caagctgcct taggttatg tgatctgcct caaaccca 38

 <210> 226
 <211> 39

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 226
gaattcggcg cgcttattc ctacttctt aaactttct 39

5 <210> 227
<211> 107
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 227
gcgcgcgat cgcgccaccat ggccttgacc ttgtctttac tggaggccct cctgggtgctc 60
10 agctgcaagt caagctgctc tgtgggctgt gatctgcctc aaaccca 107

<210> 228
<211> 59
<212> DNA
<213> Homo sapiens

15 <400> 228
gcgcgcatcg atgagcaacc tcactctgt gtgcatctc ctacttctt aaactttct 59

<210> 229
<211> 25
<212> DNA
20 <213> Homo sapiens

<400> 229
gcatgtgatc tgctcaaac ccaca 25

<210> 230
<211> 59
25 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 230
gcgcgcatcg atgagcaacc tcactctgt gtgcatctc ctacttctt aaactttct 59

<210> 231
30 <211> 40
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 231
cgcgcgctc gacaaaagaa tgagctacaa ctgcttga 40

35 <210> 232
<211> 55
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 232
40 gcgcgcatcg atgagcaacc tcactctgt gtgcatcgtt tcggaggtaa cctgt 55

<210> 233
<211> 106
<212> DNA
<213> Homo sapiens

45 <400> 233
gcgcggatcc gaattccgcc gccatgacca acaagtgtct cctccaaatt gctctcctgt 60
tgtgtctctc cactacagct ctttccatga gctacaactt gcttgg 106

<210> 234
<211> 55
<212> DNA
50 <213> Homo sapiens

<400> 234
 gcgcgcacg atgagcaacc tcactctgt gtgcatcgt tcggaggtaa cctgt 55

 <210> 235
 <211> 38
 5 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 235
 caagctgcct taggcttatg tgatctgcct caaaccca 38

 <210> 236
 10 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 236
 gcgcattggc gccttattc ctctctctt aatctttt 39

 15 <210> 237
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 237
 20 caagctgcct taggcttatg tgatctgcct caaaccca 38

 <210> 238
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 25 <400> 238
 gcgcattggc gccttattc ctactcttc aatctttt 38

 <210> 239
 <211> 38
 <212> DNA
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 239
 caagctgcct taggcttatg tgatctgcct caaaccca 38

 <210> 240
 <211> 39
 35 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 240
 gcgcattggc gccttattc ctctctctt aatctttt 39

 <210> 241
 40 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 241
 caagctgcct taggcttatg tgatctgcct caaaccca 38

 45 <210> 242
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 242
 50 gcgcattggc gccttattc ctctctctt aatctttt 39

 <210> 243
 <211> 21

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 243
agaagtgtctg caaggctgac g 21

5 <210> 244
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 244
10 acctgacctt caggaaagag 20

<210> 245
<211> 2418
<212> DNA
<213> Homo sapiens

15 <400> 245
atgaacattt tctacatttt cttgttcttg ttgtctttcg ttcaagggtt ggaacacact 60
cacagaagag gttcttttga taagagagat gcacacaaga gtgaggttgc tcatcgattt 120
aaagatttgg gagaagaaaa tttcaaagcc ttggtgttga ttgcctttgc tcagtatctt 180
cagcagtgtc catttgaaga tcatgtaaaa ttagtgaatg aagtaactga atttgcaaaa 240
acatgtgttg ctgatgagtc agctgaaaat tgtgacaaat cacttcatac ctttttttga 300
gacaaattat gcacagttgc aactcttcgt gaaacctatg gtgaaatggc tgactgctgt 360
gcaaaacaag aacctgagag aaatgaatgc ttcttgcaac acaaaagatga caacccaaac 420
ctccccgat tgggtgagacc agagggttgat gtgatgtgca ctgcttttca tgacaatgaa 480
gagacatttt tgaaaaaata cttatatgaa attgccagaa gacatcctta cttttatgcc 540
ccggaactcc ttttcttttg taaaaggat aaagctgctt ttacagaatg ttgccaagct 600
gctgataaag ctgacctgct gtgtgcaaaag ctcgatgaac ttcgggatga agggaaggct 660
tcgtctgcca aacagagact caagtgtgcc agtctccaaa aatttggaga aagagctttc 720
aaagcatggg cagttagctcg cctgagccag agatttccca aagctgagtt tgcaagaagt 780
tccaagttag tgacagatct taccaaagtc cacacggaat gctgccatgg agatctgctt 840
gaatgtgctg atgacagggc ggaccttgcc aagtatatct gtgaaaatca agattcgatc 900
tccagtaaac tgaaggaatg ctgtgaaaaa cctctgttgg aaaaatccca ctgcattgcc 960
gaagtggaaa atgatgagat gcctgctgac ttgccttcat tagctgctga ttttgttgaa 1020
agtaaggatg tttgcaaaaa ctatgctgag gcaaaaggat tcttctctgg catgtttttg 1080
tatagatatg caagaaggca tcctgattac tctgtctgag tgctgctgag acttgccaag 1140
acatatgaaa ccactctaga gaagtgtgtg gccgctgag atcctcatga atgctatgcc 1200
aaagtgttcg atgaatttaa acctcttggt gaagagcctc agaatttaat caacaaaaat 1260
tgtgagcttt ttgagcagct tggagagtac aaattccaga atgcgctatt agttcgttac 1320
accaagaaa taccccaagt gtcaactcca actcttgtag aggtctcaag aaacctagga 1380
aaagtgggca gcaaatgttg taaacatcct gaagcaaaaa gaatgccctg tgcagaagac 1440
tatctatccg tggtcctgaa ccagttatgt gtgttgcatg agaaaaagcc agtaagtgaac 1500
agagtcacca aatgtcgcac agaatccttg gtgaacaggc gacctgctt ttcagctctg 1560
gaagtcatg aaacatacgt tcccaaagag tttaatgctg aaacattcac cttccatgca 1620
gatatatgca cactttctga gaaggagaga caaatcaaga aacaaactgc acttgttgag 1680
ctcgtgaaac acaagcccaa ggcaacaaaa gagcaactga aagctgttat ggatgatttc 1740
gcagcttttg tagagaagtg ctgcaaggct gacgataagg agacctgctt tgcaggaggag 1800
ggtaaaaaac ttgttgctgc aagtcaagct gccttaggct tattcccaac aattccctta 1860
tccaggcttt ttgacaacgc tatgctccgc gccatcgtc tgcaccagct gccctttgac 1920
acctaccagg agtttgaaga agcctatatc ccaaaggaaac agaagtattc attcctgcag 1980
aacccccaga cctccctctg tttctcagag tctattccga caccctccaa caggaggaggaa 2040
acacaacaga aatccaacct agagctgctc cgcattctcc tgctgctcat ccagtcgtgg 2100
ctggagcccg tgcagttcct caggagtgtc ttcgccaaca gcctggtgta cggcgctctc 2160
gacagcaacg tctatgacct cctaaaggac ctgaggaag gcatccaaac gctgatgggg 2220
aggctggaag atggcagccc ccggactggg cagatcttca agcagacctt cagcaagttc 2280
gacacaaact cacacaacga tgacgcacta ctcaagaact acgggtgctt ctactgcttc 2340
aggaaggaca tggacaaggc cgagacattc ctgctgcatg tgcagtgcgc ctctgtggag 2400
ggatcctgtg gcttctaa 2418

<210> 246
<211> 2388
<212> DNA
20 <213> Homo sapiens

<400> 246

ES 2 567 634 T3

atgcttttgc	aagcttttcc	tttccctttt	gctgggtttt	cagccaaaat	atcggcagat	60
gcacacaaga	gtgaggttgc	tcacgcattt	aaagattttg	gagaagaaaa	tttcaaagcc	120
ttgggtgtga	ttgcctttgc	tcagtatctt	cagcagtgct	catttgaaga	tcattgtaaaa	180
ttagtgaatg	aagtaactga	atttgcaaaa	acatgtgttg	ctgatgagtc	agctgaaaaat	240
tgtgacaaat	cacttcatac	ccttttttga	gacaaattat	gcacagttgc	aactcttcgt	300
gaaacctatg	gtgaaatggc	tgactgctgt	gcaaaaacaag	aacctgagag	aaatgaatgc	360
ttctttgcaac	acaaaagatga	caaccccaaac	ctcccccgat	tggtgagacc	agaggttgat	420
gtgatgtgca	ctgcttttca	tgacaatgaa	gagacatttt	tgaaaaaata	cttatatgaa	480
attgccagaa	gacatcctta	cttttatgcc	cgggaactcc	ttttctttgc	taaaagggtat	540
aaagctgctt	ttacagaatg	ttgccaaagct	gctgataaag	ctgcctgcct	gttgccaaag	600
ctcgatgaac	ttcgggatga	agggaaggct	tcgtctgcc	aacagagact	caagtgtgcc	660
agtctccaaa	aatttggaga	aagagctttc	aaagcatggg	cagtagctcg	cctgagccag	720
agatttccca	aagctgagtt	tcgagaagtt	tccaagttag	tgacagatct	taccaaagtc	780
cacacgggaat	gctgccatgg	agatctgctt	gaatgtgctg	atgacagggc	ggaccttgcc	840
aagtatatct	gtgaaaatca	agattcgatc	tccagtaaac	tgaaggaaatg	ctgtgaaaaa	900
cctctgttgg	aaaaatccca	ctgcattgcc	gaagtggaaa	atgatgagat	gcctgctgac	960
ttgccttcac	tagctgctga	ttttgttgaa	agtaaggatg	tttgcaaaaa	ctatgctgag	1020
gcaaaggatg	tcttccctgg	catgtttttg	tatgaatatg	caagaaggca	tcctgattac	1080
tctgtcgtgc	tgctgctgag	acttgccaag	acatatgaaa	ccactctaga	gaagtgtgtg	1140
gccgctgcag	atcctcatga	atgctatgcc	aaagtgttcg	atgaatttaa	acctcttggt	1200
gaagagcctc	agaatttaat	caaacaaaat	tgtgagcttt	ttgagcagct	tgagaggtac	1260
aaattccaga	atggcgtatt	agttcggtac	accaagaaag	tacccaagt	gtcaactcca	1320
actctttag	aggtctcaag	aaacctagga	aaagtgggca	gcaaatgttg	taaacatcct	1380
gaagcaaaaa	gaatgccctg	tcgagaagac	tatctatccg	tggtcctgaa	ccagttatgt	1440
gtgttgcattg	agaaaacgcc	agtaagtgc	agagtcacca	aatgctgcac	agaatccttg	1500
gtgaacaggc	gaccatgctt	ttcagctctg	gaagtcgag	aaacatacgt	tcccaaagag	1560
tttaattgctg	aaacattcac	cttccatgca	gatatatgca	cactttctga	gaaggagaga	1620
caaatcaaga	aacaaactgc	acttgttgag	ctcgtgaaac	acaagcccaa	ggcaacaaaa	1680
gagcaactga	aagctgttat	ggatgatattc	gcagcttttg	tagagaagtg	ctgcaaggct	1740
gacgataagg	agacctgctt	tgccgaggag	ggtaaaaaac	ttgttgctgc	aagtcaagct	1800
gccttaggct	tattcccaac	aattccctta	tcaggcttt	ttgacaacgc	tatgtccgc	1860
gcccacgtc	tgcaccagct	ggcctttgac	acctaccagg	agtttgaaga	agcctatatac	1920
ccaaagggaac	agaagtattc	attcctgcag	aacccccaga	cctccctctg	tttctcagag	1980
tctattccga	caccttccaa	cagggaggaa	acacaacaga	aatccaacct	agagctgctc	2040
cgcatctccc	tgctgccttc	ccagtcgtgg	ctggagcccg	tgagttcct	caggagtgtc	2100
ttcgccaaca	ccttggtgta	cggcgctctt	gacagcaacg	tctatgacct	cctaaaggac	2160
ctagagggaag	gcattccaaac	gctgatgggg	aggctggaag	atggcagccc	ccggactggg	2220
cagatcttca	agcagacctc	cagcaagttc	gacacaaact	cacacaacga	tgacgcacta	2280
ctcaagaact	acgggctgct	ctactgcttc	aggaaggaca	tggacaaggt	cgagacattc	2340
ctgcgcacgc	tgcaagtgcg	ctctgtggag	ggatcctgtg	gcttctaa		2388

<210> 247
 <211> 2382
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

atgttcaagt	ctgttgttta	ctctattttg	gctgcttctt	tggttaacgc	tgatgcacac	60
aagagtgaag	ttgctcatcg	atttaaagat	ttgggagaag	aaaatttcaa	agccttggtg	120
ttgattgcct	ttgctcagta	tcttcagcag	tgtccatttg	aagatcatgt	aaaatttagtg	180
aatgaagtaa	ctgaatttgc	aaaaacatgt	gttgctgatg	agtcagctga	aaattgtgac	240
aaatcacttc	ataccctttt	tggagacaaa	ttatgcacag	ttgcaactct	tcgtgaaacc	300
tatggtgaaa	tggctgactg	ctgtgcaaaa	caagaacctg	agagaaatga	atgcttcttg	360
caacacaaaag	atgacaaccc	aaacctcccc	cgatttggtga	gaccagaggt	tgatgtgatg	420
tgcactgctt	ttcatgacaa	tgaagagaca	tttttgaaaa	aatacttata	tgaaattgcc	480
agaagacatc	cttactttta	tgccccggaa	ctccttttct	ttgctaaaag	gtataaagct	540
gcttttacag	aatgttgcca	agctgctgat	aaagctgcct	gcctgttgcc	aaagctcgat	600
gaacttcggg	atgaagggaa	ggcttcgtct	gccaaacaga	gactcaagtg	tgccagtctc	660
caaaaatttg	gagaaagagc	tttcaaagca	tgggcagtag	ctcgcttag	ccagagattt	720
cccaaagctg	agtttgcaga	agttttccaa	ttagtgcag	atcttaccac	agttccacacg	780
gaatgctgcc	atggagatct	gcttgaatgt	gctgatgaca	ggcgaggacct	tgccaagtat	840
atctgtgaaa	atcaagattc	gatctccagt	aaactgaagg	aatgctgtga	aaaacctctg	900
ttggaaaaat	gcacctgcac	tgccgaagtg	gaaaatgatg	agatgcctgc	tgacttgcct	960
tcattagctg	ctgattttgt	tgaaagtaag	gatgtttgca	aaaactatgc	tgaggcaaaag	1020
gatgtcttcc	tgggcatggt	tttgatgtaa	tatgcaagaa	ggcatcctga	ttactctgtc	1080
gtgctgctgc	tgagacttgc	caagacatat	gaaaccactc	tagagaagtg	ctgtgccgct	1140

gcagatcctc	atgaatgcta	tgccaaagt	ttcgatgaat	ttaaacctct	tgtggaagag	1200
cctcagaatt	taatcaaaca	aaattgtgag	ctttttgagc	agcttggaga	gtacaaattc	1260
cagaatgcgc	tattagttcg	ttacaccaag	aaagtacccc	aagtgtcaac	tccaactctt	1320
gtagaggctc	caagaaacct	aggaaaagt	ggcagcaaat	gttgtaaaca	tcctgaagca	1380
aaaagaatgc	cctgtgcaga	agactatcta	tccgtgggtc	tgaaccagtt	atgtgtgttg	1440
catgagaaaa	cgccagtaag	tgacagagtc	accaaagtgc	gcacagaatc	cttggtgaac	1500
aggcgaccat	gcttttcagc	tctggaagtc	gatgaaacat	acgttcccaa	agagtttaat	1560
gctgaaacat	tcaccttcca	tgacagatata	tgacaccttt	ctgagaagga	gagacaaatc	1620
aagaaacaaa	ctgcacttgt	tgagctcgtg	aaacacaagc	ccaaggcaac	aaaagagcaa	1680
ctgaaaagctg	ttatggatga	tttcgcagct	tttgtagaga	agtgtctgca	ggctgacgat	1740
aaggagacct	gctttgccga	ggagggtaaa	aaacttggtg	ctgcaagtca	agctgcctta	1800
ggcttattcc	caacaattcc	cttatccagg	ctttttgaca	acgttatgct	ccgcgccccat	1860
cgtctgcacc	agctggcctt	tgacacctac	caggagtttg	aagaagccta	tatcccaaag	1920
gaacagaagt	attcattcct	gcagaacccc	cagacctccc	tctgtttctc	agagtctatt	1980
ccgacacctc	ccaacaggga	ggaaacacaa	cagaaatcca	acctagagct	gctccgcctc	2040
tccttgctgc	tcattccagtc	gtggctggag	cccgtgcagt	tcctcaggag	tgtcttcgcc	2100
aacagcctgg	tgtacggcgc	ctctgacagc	aacgtctatg	acctcctaaa	ggacctagag	2160
gaaggcatcc	aaacgctgat	ggggaggctg	gaagatggca	gccccgggac	tgggcagatc	2220
ttcaagtcaga	cctacagcaa	gttcgacaca	aactcacaca	acgatgacgc	actactcaag	2280
aactacgggc	tgtcttactg	cttcaggaag	gacatggaca	aggtcgagac	attcctgcgc	2340
atcgtgcagt	gccgctctgt	ggagggatcc	tgtggcttct	aa		2382

<210> 248

<211> 2403

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 248

atgaagtggg	taagctttat	ttcccttctt	tttctcttta	gctcggctta	ttccggttct	60,
ttggataaga	gagatgcaca	caagagttag	gttgctcatc	gattttaaga	tttgggagaa	120
gaaaatttca	aagccttggt	gttgattgac	tttgctcagt	atcttcagca	gtgtccattt	180
gaagatcatg	taaaattagt	gaatgaagta	actgaatttg	caaaaacatg	tgttgctgat	240
gagtcagctg	aaaattgtga	caaatacact	catacccttt	ttggagacaa	attatgcaca	300
gttgcaactc	ttcgtgaaac	ctatggtgaa	atggctgact	gctgtgcaaa	acaagaacct	360
gagagaaatg	aatgcttctt	gcaacacaaa	gatgacaacc	caaacctccc	ccgatgtggtg	420
agaccagagg	ttgatgtgat	gtgcactgct	tttcatgaca	atgaagagac	atttttgaaa	480
aaatacttat	atgaatttgc	cagaagacat	ccttactttt	atgccccgga	actccttttc	540
tttgctaaaa	ggatataaagc	tgtctttaca	gaatgttgcc	aagctgctga	taaagctgcc	600
tgctgttgcc	caaagctcga	tgaacttcgg	gatgaaggga	aggcttcgtc	tgccaaacag	660
agactcaagt	gtgcccagtc	ccaaaaatct	ggagaaagag	ctttcaaaagc	atgggcagta	720
gctcgcctga	gccagagatt	tcccaaagct	gagtttgagc	aagtttccaa	gttagtgaca	780
gatcttacca	aagtccacac	ggaatgctgc	catggagatc	tgcttgaatg	tgctgatgac	840
agggcgaggc	ttgccaaagta	tatctgtgaa	aatcaagatt	cgatctccag	taaactgaag	900
gaatgtctgt	aaaaacctct	gttggaaaaa	tcccactgca	ttgccgaagt	ggaaaatgat	960
gagatgcctg	ctgacttgcc	ttcatttagct	gctgattttg	ttgaaagtaa	ggatgtttgc	1020
aaaaactatg	ctgaggcaaa	ggatgtcttc	ctgggcatgt	ttttgtatga	atatgcaaga	1080
aggcatcctg	attactctgt	cgtgctgctg	ctgagacttg	ccaagacata	tgaaccact	1140
ctagagaagt	gctgtgccgc	tgacagatcct	catgaatgct	atgccaaagt	gttcgatgaa	1200
tttaaacctc	ttgttggaaga	gcctcagaat	ttaatcaaac	aaaattgtga	gctttttgag	1260
cagcttgagg	agtacaaatt	ccagaatgct	ctattagttc	gttacaccaa	gaaagtaccc	1320
caagtgtcaa	ctccaactct	tgtagaggct	tcaagaaacc	taggaaaagt	gggcagcaaa	1380
tgttgtaaac	atcctgaagc	aaaagaatg	ccctgtgcag	aagactatct	atccgtgggtc	1440
ctgaaccagt	tatgtgtggt	gcattgagaaa	acgccagtaa	gtgacagagt	caccaaatgc	1500
tgacagaaat	ccttggtgaa	caggcgacca	tgtcttttgc	ctctgggaag	cgatgaaaca	1560
tacgtttcca	aagagttttaa	tgctgaaaca	ttcaccttcc	atgcagatat	atgcacactt	1620
tctgagaagg	agagacaaat	caagaaacaa	actgcacttg	ttgagctcgt	gaaacacaag	1680
cccaaggcaa	caaaagagca	actgaaagct	gttatggatg	atcttcgcagc	ttttgtagag	1740
aagtgtctga	aggctgacga	taaggagacc	tgttttgccg	aggagggtaa	aaaacttggt	1800
gctgcaagtc	aagctgcctt	aggcttattc	ccaacaattc	ccttatccag	gctttttgac	1860
aacgctatgc	tccgcgcccc	tcgtctgcac	cagctggcct	ttgacacctc	ccaggagttt	1920
gaagaagcct	atatcccaaa	ggaacagaag	tattcatctc	tgacagaacc	ccagacctcc	1980

ctctgtttct	cagagtctat	tccgacacct	tccaacaggg	aggaaacaca	acagaaatcc	2040
aacctagagc	tgtctcgcat	ctccctgctg	ctcatccagt	cgtggctgga	gcccgtgcag	2100
ttcctcagga	gtgtcttcgc	caacagcctg	gtgtacggcg	cctctgacag	caacgtctat	2160
gacctcctaa	aggacctaga	ggaaggcatc	caaacgctga	tggggaggct	ggaagatggc	2220
agcccccgga	ctgggcagat	cttcaagcag	acctacagca	agttcgacac	aaactcacac	2280
aacgatgacg	cactactcaa	gaactacggg	ctgcttact	gcttcaggaa	ggacatggac	2340
aaggtcgaga	catctcctgcg	catcgtgcag	tgccgctctg	tggagggatc	ctgtggcttc	2400
ttaa						2403

<210> 249

<211> 2325
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 249

atgaagtggg	taagctttat	ttcccttctt	tttctcttta	gctcggctta	ttccggttct	60
ttggataaga	gagatgcaca	caagagttag	gttgctcatc	gatttaaaga	tttgggagaa	120
gaaaatttca	aagccttggt	gttgattgcc	tttgctcagt	atcttcagca	gtgtccattt	180
gaagatcatg	taaaattagt	gaatgaagta	actgaatttg	caaaaacatg	tggtgctgat	240
gagtcagctg	aaaatttgtga	caaatcactt	catacccttt	ttggagacaa	attatgcaca	300
gttgcaactc	ttcgtgaaac	ctatggtgaa	atggctgact	gctgtgcaaa	acaagaacct	360
gagagaaatg	aatgcttctt	gcaacacaaa	gatgacaacc	caaacctccc	ccgattgggtg	420
agaccagagg	ttgatgtgat	gtgcactgct	tttcatgaca	atgaagagac	atttttgaaa	480
aaatacttat	atgaaattgc	cagaagacat	ccttactttt	atgccccgga	actccttttc	540
tttgctaaaa	ggtataaagc	tgctttttaca	gaatgttgcc	aagctgctga	ttaaagctgcc	600
tgctgtgtgc	caaagctcga	tgaacttcgg	gatgaaggga	aggcttcgtc	tgccaaacag	660
agactcaagt	gtgccagctc	ccaaaaat	ggagaaagag	ctttcaaaagc	atgggcagta	720
gctcgcctga	gccagagatt	tcccaaagct	gagtttgacg	aagtttccaa	gttagtgaca	780
gatcttacct	aagtccacaa	ggaatgctgc	ctgggcatgt	tgcttgaatg	tgctgatgac	840
agggcggacc	ttgccaaagta	tatctgtgaa	aatcaagatt	cgatctccag	taaactgaag	900
gaatgctgtg	aaaaacctct	gttggaaaaa	tcccactgca	ttgccgaagt	ggaaaatgat	960
gagatgcctg	ctgacttgcc	ttcatttagct	gctgattttg	ttgaaagtaa	ggatgtttgc	1020
aaaaactatg	ctgaggcaaa	ggatgtcttc	ctgggcatgt	ttttgtatga	atatgcaaga	1080
aggcatcctg	attactctgt	cgtgctgctg	ctgagacttg	ccaagacata	tgaaccact	1140
ctagagaagt	gctgtgccgc	tgccagatcct	catgaatgct	atgccaaagt	gttcgatgaa	1200
tttaaacctc	ttgtggaaga	gcctcagaat	ttaatcaaac	aaaattgtga	gctttttgag	1260
cagcttgagg	agtaaaaatt	ccagaatgcg	ctattagttc	gttacaccaa	gaaagtacct	1320
caagtgtcaa	ctccaactct	tgtagaggtc	tcaagaaacc	taggaaaagt	gggcagcaaa	1380
tggttgtaaac	atcctgaagc	aaaaagaatg	ccctgtgcag	aagactatct	atccgtgggtc	1440
ctgaaccagt	tatgtgtgtt	gcattgagaaa	acgccagtaa	gtgacagagt	caccaaattgc	1500
tgacagaaat	ccttgggtgaa	caggcgacca	tgcttttcag	ctctggaagt	cgatgaaaca	1560
tacgttycca	aagagtttaa	tgctgaaaca	ttcaccttcc	atgcagatat	atgcacactt	1620
tctgagaagg	agagacaaat	caagaaacaa	actgcacttg	ttgagctcgt	gaaacacaag	1680
cccaaggcaa	caaaagagca	actgaaagct	gttatggatg	atcttcgcagc	ttttgtagag	1740
aagtgtctga	aggctgacga	taaggagacc	tgctttgccc	aggagggtaa	aaaacttggt	1800
gctgcgaagt	aagctgcctt	aggcttatgt	gatctgcctc	aaaccacacg	cctgggttct	1860
agaaggacct	tgatgtctct	ggcacagatg	aggagaatct	ctctttttct	ctgcttgaag	1920
gacagacatg	actttggatt	tccccaggag	gagtttggca	accagttcca	aaaggctgaa	1980
accatccctg	tcttccatga	gatgatccag	cagatcttca	atctcttcag	cacaaaggac	2040
tcattctgct	cttgggatga	gacctccta	gacaaattct	acactgaact	ctaccagcag	2100
ctgaatgacc	tggaagcctg	tgatgatacag	gggggtgggg	tgacagagac	tccccctgatg	2160
aaggaggact	ccattctggc	tgatgagaaa	tacttccaaa	gaatcactct	ctatctgaaa	2220
gagaagaaat	acagcccttg	tgccctgggag	gttgtcagag	cagaaatcat	gagatctttt	2280
5 tctttgtcaa	caaacttgca	agaaagttaa	agaagtaagg	aataa		2325

<210> 250
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 250

cactctgacc	ctgcccgcgc	aggggagctg	agcgtgtgtg	acagtattag	tgagtgggta	60
acggcggcag	acaaaaagac	tgcagtggac	atgtcgggcg	ggacggtcac	agtccctgaa	120
aaggctccctg	tatcaaaaagg	ccaactgaag	caatacttct	acgagaccaa	gtgcaatccc	180
atgggtttaca	caaaagaagg	ctgcaggggc	atagacaaaa	ggcattggaa	ctcccagtg	240
cgaactaccc	agtcgtacgt	gcggggccctt	accatggata	gcaaaaagag	aattggctgg	300
cgattcataa	ggatagacac	ttcttgtgta	tgtacattga	ccattaaaag	gggaaga	357

<210> 251
<211> 90
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 251

cacggtgaag	gtactttcac	ttctgatgtt	tcttcttact	tggaaggcca	agctgctaag	60
gaattcattg	cttgggttgg	taagggtaga				90

<210> 252
<211> 96
<212> DNA
<213> Homo sapiens

	<400> 252						
	agccccaaga	tgggtgcaagg	gtctggctgc	tttgggagga	agatggaccg	gatcagctcc	60
	tccagtggcc	tgggctgcaa	agtgctgagg	cggcat			96
	<210> 253						
	<211> 96						
5	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<400> 253						
	agccccaaga	tgggtgcaagg	gtctggctgc	tttgggagga	agatggaccg	gatcagctcc	60
	tccagtggcc	tgggctgcaa	agtgctgagg	cggcat			96
	<210> 254						
	<211> 2004						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<400> 254						
	atgaaggctct	cctgtggctgc	cctctcctgc	ctcatgcttg	tacttgcct	tggatcccag	60
	gccccacggtg	aaggctacttt	cacttctgat	gtttcttctt	acttgggaagg	tcaagctgct	120
	aaggaatttca	ttgcttggtt	ggttaagggt	agacacggtg	aaggctacttt	cacttctgat	180
	gtttcttctt	acttgggaagg	tcaagctgct	aaggaatttca	ttgcttggtt	ggtaaagggt	240
	agagatgac	acaagagtga	ggttgctcat	cgatttaaaag	atttgggaga	agaaaaatttc	300
	aaagccttgg	tgttgattgc	ctttgctcag	tatcttcagc	agtgtccatt	tgaagatcat	360
	gtaaaatttag	tgaatgaagt	aactgaattt	gcaaaaacat	gtgttgctga	tgagtcagct	420
	gaaaatttgt	acaaatcact	tcataccctt	tttggagaca	aattatgcac	agttgcaact	480
	cttcgtgaaa	cctatggtga	aatggctgac	tgctgtgcaa	aacaagaacc	tgagagaaat	540
	gaatgcttct	tgcaacacaa	agatgacaac	ccaaaccttc	cccgatitgg	gagaccagag	600
	gttgatgtga	tgtgcactgc	ttttcatgac	aatgaagaga	catttttgaa	aaaatactta	660
	tatgaaattg	ccagaagaca	tccttacttt	tatgccccgg	aactcctttt	ctttgtctaaa	720
	aggtataaaag	ctgctttttac	agaatgttgc	caagctgctg	ataaagctgc	ctgcctgttg	780
	ccaaagctcg	atgaacttcg	ggatgaaggg	aaggcttctg	ctgcccacaa	gagactcaa	840
	tgtgccagtc	tccaaaaaat	tggagaaaga	gctttcaaat	catgggcagt	agctcgcttg	900
	agccagagat	ttcccaaagc	tgagtttgca	gaagttttca	agttagtgac	agatcttacc	960
	aaagtccaca	cggaatgctg	ccatggagat	ctgcttgaat	gtgctgatga	cagggcgagc	1020
	cttgccaagt	atatctgtga	aaatcaagat	tcgatctcca	gtaaaactga	ggaatgctgt	1080
	gaaaaaacctc	tgttggaaaa	atcccactgc	attgccgaag	tggaaaaatga	tgagatgcct	1140
	gctgacttgc	cttcattagc	tgctgatttt	gttgaagata	aggatgtttg	caaaaactat	1200
	gctgaggcaa	aggatgtctt	cctgggcatg	tttttgtatg	aatatgcaag	aaggcatcct	1260
15							
	gattactctg	togtgcctgt	gctgagactt	gccaagacat	atgaaaccac	tctagagaag	1320
	tgtctgtgcc	ctgcagatcc	tcataaatgc	tatgccaaaag	tgctcgatga	atttaaactc	1380
	cttgtggaag	agcctcagaa	tttaatacaa	caaaatttgt	agctttttga	gcagcttgga	1440
	gagtcacaaat	tccagaatgc	gctattagtt	cgttacacca	agaaagtacc	ccaagtgtca	1500
	actccaactc	ttgtagaggt	ctcaagaaac	ctaggaaaaag	tgggcagcaa	atgttgttaa	1560
	catcctgaag	caaaaagaat	gccctgtgca	gaagactatc	tatccgtggt	cctgaaccag	1620
	ttatgtgtgt	tgcattgaga	aacgccagta	agtgcacagag	tcaccaaattg	ctgcacagaa	1680
	tcttgtgtga	acaggcgacc	atgcttttca	gctctggaag	tcgatgaaac	atacgttccc	1740
	aaagagttta	atgctgaaac	attcaccttc	catgcagata	tatgcacact	ttctgagaag	1800
	gagagacaaa	tcaagaaaca	aactgcactt	gttgagctcg	tgaacacaaa	gccaaggca	1860
	acaaaagagc	aactgaaagc	tgttatggat	gattttcgag	cttttgtaga	gaagtgtctg	1920
	aaggctgacg	ataaggagac	ctgcttttgc	gaggagggtg	aaaaacttgt	tgctgcaagt	1980
	caagctgcct	taggcttata	ataa				2004
	<210> 255						
	<211> 87						
	<212> DNA						
20	<213> Homo sapiens						
	<400> 255						
	agccccaaga	tgggtgcaagg	gtctggctgc	tttgggagga	agatggaccg	gatcagctcc	60
	tccagtggcc	tgggctgcaa	agtgcctg				87
	<210> 256						
	<211> 96						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<400> 256						
25							

ES 2 567 634 T3

	agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggagga agatggaccg gatcagctcc	60
	tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat	96
	<210> 257	
	<211> 96	
	<212> DNA	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 257	
	agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggagga agatggaccg gatcagctcc	60
	tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat	96
	<210> 258	
	<211> 96	
10	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 258	
	agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggagga agatggaccg gatcagctcc	60
	tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat	96
	<210> 259	
	<211> 96	
15	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 259	
	agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggagga agatggaccg gatcagctcc	60
	tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat	96
20	<210> 260	
	<211> 96	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 260	
25	agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggggta agatggaccg gatcagctcc	60
	tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat	96
	<210> 261	
	<211> 1716	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 261	

atgtggtggc	gcctgtgggtg	gctgctgctg	ctgctgctgc	tgctgtggcc	catggtgtgg	60
gccagcccca	agatggtgca	aggggtctggc	tgctttggga	ggaagatgga	ccggatcagc	120
tcctccagtg	gcctgggctg	caaagtgtctg	tcacttcata	cccttttttg	agacaaaatta	180
tgcacagttg	caactcttcg	tgaaacctat	ggtgaaatgg	ctgactgctg	tgcaaaaaca	240
gaacctgaga	gaaatgaatg	cttcttgcaa	cacaaagatg	acaacccaaa	ctcccccg	300
ttggtgagac	cagaggttga	tgtgatgtgc	actgcttttc	atgacaatga	agagacattt	360
ttgaaaaaat	acttatatga	aattgccaga	agacatcctt	acttttatgc	cccggaactc	420
cttttctttg	ctaaaaggta	taaagctgct	tttacagaat	gttgccaagc	tgctgataaa	480
gctgcctgcc	tggtgccaaa	gctcgatgaa	cttcgggatg	aagggaaggc	ttcgtctgcc	540
aaacagagac	tcaagtgtgc	cagtcctcaa	aaatttggag	aaagagcttt	caaagcatgg	600
gcagtagctc	gcctgagcca	gagatttccc	aaagctgagt	ttgcagaagt	ttccaagtta	660
gtgacagatc	ttaccaaagt	ccacacggaa	tgctgccatg	gagatctgct	tgaatgtgct	720
gatgacaggg	cggaccttgc	caagtatatc	tgtgaaaatc	aagattcgat	ctccagtaaa	780
ctgaaggaa	gctgtgaaaa	acctctgttg	gaaaaatccc	actgcattgc	cgaagtggaa	840
aatgatgaga	tgctgtctga	cttgccctca	ttagctgctg	atttgttga	aagtaaggat	900
gtttgcaaaa	actatgctga	ggcaaaggat	gtcttcctgg	gcatgttttt	gtatgaatat	960
gcaagaaggc	atcctgatta	ctctgtcgtg	ctgctgctga	gacttgccaa	gacatatgaa	1020
accactctag	agaagtgtctg	tgccgctgca	gatccctcatg	aatgctatgc	caaagtgttc	1080
gatgaattta	aacctcttgt	ggaagagcct	cagaatttaa	tcaaacaaaa	ttgtgagctt	1140
tttgagcagc	ttggagagta	caaattccag	aatgcgctat	tagttcgtaa	caccaagaaa	1200
gtaccccaag	tgtcaactcc	aactcttgta	gaggtctcaa	gaaacctagg	aaaagtgggc	1260
agcaaatgtt	gtaaacatcc	tgaagcaaaa	agaatgccct	gtgcagaaga	ctatctatcc	1320
gtggtectga	accagtatatg	tgtgttgcat	gagaaaacgc	cagtaagtga	cagagtcacc	1380
aaatgctgca	cagaatcctt	ggtgaacagg	cgaccatgct	tttcagctct	ggaagtcgat	1440
gaaacatacg	ttcccaaaga	gtttaatgct	gaaacattca	ccttccatgc	agatatatgc	1500
acactttctg	agaaggagag	acaaatcaag	aaacaaactg	cacttggtga	gctcgtgaaa	1560
cacaagccca	aggcaacaaa	agagcaactg	aaagctgtta	tggatgattt	cgcagctttt	1620
gtagagaagt	gctgcaaggc	tgacgataag	gagacctgct	ttgccgagga	gggtaaaaaa	1680
cttgttgctg	caagtcaagc	tgcccttaggc	ttataa			1716

<210> 262

<211> 96

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 262

agccccaaga	tggtgcaagg	gtctggctgc	tttgggggca	agatggaccg	gatcagctcc	60
tccagtggcc	tggtgctgcaa	agtgtctgagg	cggcat			96

<210> 263

<211> 96

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 263

agccccaaga	tggtgcaagg	gtctggctgc	tttggggagg	gcatggaccg	gatcagctcc	60
tccagtggcc	tggtgctgcaa	agtgtctgagg	cggcat			96

<210> 264

15 <211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 264

agccccaaga	tggtgcaagg	gtctggctgc	tttggggagga	agatggaccg	gatcagctcc	60
tccagtggcc	tggtgctgcaa	agtgtctgagg	cggcat			96

20 <210> 265

<211> 1929

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 265

atgaagtggg	taagctttat	ttcccttctt	tttctcttta	gctcgggctta	ttccaggagc	60
ctcgacaaaa	gaagcccca	gatgggtgcaa	gggtctggct	gctttggggag	gaagatggac	120
cggatcagct	cctccagtg	cctgggctgc	aaagtgcgtga	gggttggttg	tgatgcacac	180
aagagtgagg	ttgctcatcg	atttaaagat	ttgggagaag	aaaatttcaa	agccttggtg	240
ttgattgcct	ttgctcagta	tcttcagcag	tgccatttg	aagatcatgt	aaaattagtg	300
aatgaagtaa	ctgaatttgc	aaaaacatgt	gttgctgatg	agtcagctga	aaattgtgac	360
aatcacttc	ataccctttt	tggagacaaa	ttatgcacag	ttgcaactct	tcgtgaaacc	420
tatggtgaaa	tggctgactg	ctgtgcacaaa	caagaacctg	agagaaatga	atgcttcttg	480
caacacaaa	atgacaaccc	aaacctcccc	cgattggtga	gaccagaggt	tgatgtgatg	540
tgcactgctt	ttcatgacaa	tgaagagaca	tttttgaaaa	aatacttata	tgaaattgcc	600
agaagacatc	cttactttta	tgccccggaa	ctccttttct	ttgctaaaag	gtataaagct	660
gcttttacag	aatgttgcca	agctgctgat	aaagctgcct	gectgttgcc	aaagctcgat	720
gaacttcggg	atgaaggga	ggcttctgt	gccaaacaga	gactcaagt	tgccagtctc	780
caaaaatttg	gagaagagc	tttcaaagca	tgggcagtag	ctcgcctgag	ccagagattt	840
cccaaagctg	agtttgcaga	agttttccaa	ttagtgcag	atcttaccaa	agtccacacg	900
gaatgctgcc	atggagatct	gcttgaatgt	gctgatgaca	gggcggaact	tgccaagtat	960
atctgtgaaa	atacaagattc	gatctccagt	aaactgaag	aatgctgtga	aaaacctctg	1020
ttggaaaaat	cccaatgcat	tgccgaagt	gaaaatgatg	agatgcctgc	tgacttgctt	1080
tcattagctg	ctgattttgt	tgaagtaag	gatgtttgca	aaaactatgc	tgaggcaaa	1140
gatgtcttcc	tgggcatgtt	tttgtatgaa	tatgcaagaa	ggcatcctga	ttactctgtc	1200
gtgctgctgc	tgagacttgc	caagacatat	gaaaccactc	tagagaagt	ctgtgcccgt	1260
gcagatcctc	cccaatgcta	tgccaaaagt	ttcgatgaat	ttaaactctc	tgtggaagag	1320
cctcagaatt	taatacaaca	aaattgtgag	ctttttgagc	agcttgagga	gtacaaaattc	1380
cagaatgcgc	tattagttcg	ttacaccaag	aaagtacccc	aagtgtcaac	tccaactctt	1440
gtagaggctc	caagaacct	aggaaaagt	ggcagcaaat	gttgtaaaaa	tcctgaagca	1500
aaaagaatgc	agactatcta	tccgtgggtc	tgaaccagtt	atgtgtgttg	atgtgtgttg	1560
catgagaaaa	cgccagtaag	tgacagagtc	accaaattgct	gcacagaatc	cttggtgaac	1620
aggcgaccat	gcttttcagc	tctggaagtc	gatgaaacat	acgttcccaa	agagtttaatt	1680
gctgaaacat	tcactttcca	tgcagatata	tgacactttt	ctgagaagga	gagacaaatc	1740
aagaaacaaa	ctgcacttgt	tgagcttgtg	aaacacaagc	ccaaggcaac	aaaagagcaa	1800
ctgaaaagctg	ttatggatga	tttcgcagct	tttgtagaga	agtgtgcaa	ggctgacgat	1860
aaggagacct	gctttgccga	ggagggtaaa	aaactgtgtg	ctgcaagtca	agctgcctta	1920
ggcttataaa						1929

<210> 266

<211> 456

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 266

atgagctect	tctccaccac	caccgtgagc	ttcctccttt	tactggcatt	ccagctccta	60
ggtcagacca	gagctaattc	catgtacaat	gccgtgtcca	acgcagacct	gatggatttc	120
aagaatttgc	tggaccattt	ggaagaaaag	atgcctttag	aagatgaggt	cgtgccccca	180
caagtgtca	gtgagccgaa	tgaagaagcg	ggggctgctc	tcagccccct	ccctgaggtg	240
cctccctgga	ccggggaagt	cagcccagcc	cagagagatg	gaggtgccct	cgggcggggc	300
ccctgggact	cctctgatcg	atctgccttc	ctaaaaagca	agctgagggc	gctgctcact	360

gccccctcga	gcctgcggag	atccagctgc	ttcgggggca	ggatggacag	gattggagcc	420
cagagcggac	tgggtgttaa	cagcttccgg	tactga			456

10 <210> 267

<211> 456

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 267

atgagctect	tctccaccac	caccgtgagc	ttcctccttt	tactggcatt	ccagctccta	60
ggtcagacca	gagctaattc	catgtacaat	gccgtgtcca	acgcagacct	gatggatttc	120
aagaatttgc	tggaccattt	ggaagaaaag	atgcctttag	aagatgaggt	cgtgccccca	180
caagtgtca	gtgagccgaa	tgaagaagcg	ggggctgctc	tcagccccct	ccctgaggtg	240
cctccctgga	ccggggaagt	cagcccagcc	cagagagatg	gaggtgccct	cgggcggggc	300
ccctgggact	cctctgatcg	atctgccttc	ctaaaaagca	agctgagggc	gctgctcact	360
gccccctcga	gcctgcggag	atccagctgc	ttcgggggca	ggatggacag	gattggagcc	420
cagagcggac	tgggtgttaa	cagcttccgg	tactga			456

15 <210> 268

<211> 456

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <400> 268

	atgagctcct	tctccaccac	caccgtgagc	ttcctccttt	tactggcatt	ccagctccta	60
	ggtcagacca	gagctaatac	catgtacaat	gccgtgtcca	acgcagacct	gatggatttc	120
	aagaatttgc	tggaccattt	ggaagaaaag	atgccttttag	aagatgaggt	cgtgccccca	180
	caagtgtca	gtgagccgaa	tgaagaagcg	ggggctgctc	tcagccccct	ccctgaggtg	240
	cctccctgga	ccggggaagt	cagcccagcc	cagagagatg	gaggtgccct	cgggcggggc	300
	ccctgggact	cctctgatcg	atctgccctc	ctaaaaagca	agctgagggc	gctgctcact	360
	gccccctcga	gcctgcggag	atccagctgc	ttcgggggca	ggatggacag	gattggagcc	420
	cagagcggac	tgggctgtaa	cagcttccgg	tactga			456
	<210> 269						
	<211> 456						
	<212> DNA						
5	<213> Homo sapiens						
	<400> 269						
	atgagctcct	tctccaccac	caccgtgagc	ttcctccttt	tactggcatt	ccagctccta	60
	ggtcagacca	gagctaatac	catgtacaat	gccgtgtcca	acgcagacct	gatggatttc	120
	aagaatttgc	tggaccattt	ggaagaaaag	atgccttttag	aagatgaggt	cgtgccccca	180
	caagtgtca	gtgagccgaa	tgaagaagcg	ggggctgctc	tcagccccct	ccctgaggtg	240
	cctccctgga	ccggggaagt	cagcccagcc	cagagagatg	gaggtgccct	cgggcggggc	300
	ccctgggact	cctctgatcg	atctgccctc	ctaaaaagca	agctgagggc	gctgctcact	360
	gccccctcga	gcctgcggag	atccagctgc	ttcgggggca	ggatggacag	gattggagcc	420
	cagagcggac	tgggctgtaa	cagcttccgg	tactga			456
	<210> 270						
	<211> 456						
10	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<400> 270						
	atgagctcct	tctccaccac	caccgtgagc	ttcctccttt	tactggcatt	ccagctccta	60
	ggtcagacca	gagctaatac	catgtacaat	gccgtgtcca	acgcagacct	gatggatttc	120
	aagaatttgc	tggaccattt	ggaagaaaag	atgccttttag	aagatgaggt	cgtgccccca	180
	caagtgtca	gtgagccgaa	tgaagaagcg	ggggctgctc	tcagccccct	ccctgaggtg	240
	cctccctgga	ccggggaagt	cagcccagcc	cagagagatg	gaggtgccct	cgggcggggc	300
	ccctgggact	cctctgatcg	atctgccctc	ctaaaaagca	agctgagggc	gctgctcact	360
	gccccctcga	gcctgcggag	atccagctgc	ttcgggggca	ggatggacag	gattggagcc	420
	cagagcggac	tgggctgtaa	cagcttccgg	tactga			456
15	cagagcggac tgggctgtaa cagcttccgg tactga						456
	<210> 271						
	<211> 456						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
20	<400> 271						
	atgagctcct	tctccaccac	caccgtgagc	ttcctccttt	tactggcatt	ccagctccta	60
	ggtcagacca	gagctaatac	catgtacaat	gccgtgtcca	acgcagacct	gatggatttc	120
	aagaatttgc	tggaccattt	ggaagaaaag	atgccttttag	aagatgaggt	cgtgccccca	180
	caagtgtca	gtgagccgaa	tgaagaagcg	ggggctgctc	tcagccccct	ccctgaggtg	240
	cctccctgga	ccggggaagt	cagcccagcc	cagagagatg	gaggtgccct	cgggcggggc	300
	ccctgggact	cctctgatcg	atctgccctc	ctaaaaagca	agctgagggc	gctgctcact	360
	gccccctcga	gcctgcggag	atccagctgc	ttcgggggca	ggatggacag	gattggagcc	420
	cagagcggac	tgggctgtaa	cagcttccgg	tactga			456
	<210> 272						
	<211> 381						
	<212> DNA						
25	<213> Homo sapiens						
	<400> 272						
	atgcattctct	cccagctgct	ggcctgcgcc	ctgctgctca	cgctgctctc	cctccggccc	60
	tccgaagcca	agccccgggc	gccgccgaag	gtccccgcaa	ccccgcgggc	agaggagctg	120
	gccgagccgc	aggctgcggg	cgccggtcag	aagaaggcgc	acaaggctcc	cggggcgggg	180
	ggcgccaatc	tcaaggcgca	ccggctcgca	ctgctccggg	acctgcgcgt	ggacaccaag	240
	tcgcgggcag	cgtgggctcg	ccttctgcaa	gagcacccca	acgcgcgcaa	atacaaagga	300
	gccaacaaga	agggtctgtc	caagggctgc	ttcggcctca	agctggaccg	aatcgggtcc	360
	atgagcggcc	tgggatgtta	g				381
	<210> 273						
	<211> 381						

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 273
atgcatctct cccagctgct ggcttgcgcc ctgctgctca cgctgctctc cctccggccc 60
tccgaagcca agcccggggc gccgcggaag gtcccgcgaa ccccgccggc agaggagctg 120
gccgagccgc aggtctgggg cggtcggtcag aagaaggcg acaaggctcc cggggggcggg 180
ggcgccaatc tcaagggcga ccggtcgca ctgctccggg acctgcgctg ggacaccaag 240
tcgctggcag cgtgggctcg ccttctgcaa gaggaccca acgctcgcaa atacaaagga 300
gccaacaaga agggcttgct caagggtgc ttccggctca agctggaccg aatcggctcc 360
atgagcggcc tgggatgtta g 381

5 <210> 274
<211> 114
<212> DNA
<213> Dendroaspis angusticeps

<400> 274
gaagttaagt acgatccatg ttccgggtcac aagattgata gaattaacca cgtttctaac 60
10 ttgggttgct catctttgag agatccaaga ccaaacgctc catctacttc tgct 114

<210> 275
<211> 114
<212> DNA
<213> Dendroaspis angusticeps

15 <400> 275
gaagttaagt acgatccatg ttccgggtcac aagattgata gaattaacca cgtttctaac 60

ttgggttgct catctttgag agatccaaga ccaaacgctc catctacttc tgct 114

<210> 276
<211> 1929
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 276
atgaagtggg taagctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccggtagc 60
ctcgacaaaa gaagcccaaa gatggtgcaa gggctctggc gctttgggag gaagatggac 120
cggatcagct cctccagtgg cctgggctgc aaagtgtga ggggtgggtg tgatgcacac 180
aagagttagg ttgctcatcg atttaaagat ttgggagaag aaaaattcaa agccttggtg 240
ttgattgcct ttgctcagta tcttcagcag tgtccatttg aagatcatgt aaaaattagt 300
aatgaagttaa ctgaatttgc aaaaacatgt gttgctgatg agtcagctga aaattgtgac 360
aaatcacttc ataccctttt tggagacaaa ttatgcacag ttgcaactct tcgtgaaacc 420
tatggtgaaa tggctgactg ctgtgcaaaa caagaacctg agagaaatga atgcttcttg 480
caacacaaa atgacaaccc aaacctcccc cgattgggtg gaccagaggt tgatgtgatg 540
tgcactgctt ttcatgacaa tgaagagaca tttttgaaaa aatacttata tgaaattgcc 600
agaagacatc cttactttta tggcccgga ctccttttct ttgctaaaag gtataaagct 660
gcttttacag aatgttgcca agctgctgat aaagctgcct gcctgttgcc aaagctcgat 720
gaacttcggg atgaagggaa ggcttcgtct gccaaacaga gactcaagtg tgccagcttc 780
caaaaatttg gagaaagagc tttaaagca tgggcagtag ctgcctgag ccagagattt 840
cccaaagctg agtttgaga agtttccaag ttatgtacag atcttaccac agtccacacg 900
gaatgctgcc atggagatct gcttgaatgt gctgatgaca gggcggacct tgccaagtat 960
atctgtgaaa atcaagattc gatctccagt aaactgaagg aatgctgtga aaaacctctg 1020
ttggaaaaat cccactgcat tgccgaagtg gaaaatgatg agatgcctgc tgacttgctc 1080
tcattagctg ctgattttgt tgaaagttaag gatgtttgca aaaactatgc tgaggcaaaag 1140
gatgtcttcc tgggcatgtt ttgtatgaa tatgcaagaa ggcacctga ttactctgtc 1200
gtgctgctgc tgagacttgc caagacatat gaaaccactc tagagaagtg ctgtgccgct 1260
gcagatcctc atgaatgcta tgccaaagtg ttcgatgaat ttaaacctct tgtggaagag 1320
cctcagaatt taatcaaaaca aaattgtgag ctttttgagc agcttgagga gtacaaattc 1380
cagaatgcgc tattagttcg ttacaccaag aaagtacccc aagtgtcaac tccaactctt 1440
gtagaggtct caagaaacct aggaaaagtg ggcagcaaat gttgtaacaa tcctgaagca 1500
aaaagaatgc cctgtgcaga agactatcta tccgtggtcc tgaaccagtt atgtgtgttg 1560
catgagaaaa cgccagtaag tgacagagtc accaaatgct gcacagaatc cttggtgaac 1620
aggcgacct gcttttcagc tctggaagtc gatgaaacat acgttcccaa agagtttaac 1680
gctgaaacat tcaccttcca tgacagatata tgcacacttt ctgagaagga gagacaaatc 1740
aagaaacaaa ctgcacttgt tgagcttgtg aaacacaagc ccaaggcaac aaaagagcaa 1800
ctgaaagctg ttatggatga ttctgcagct tttgtagaga agtgcctgca ggctgacgat 1860
aaggagacct gctttgccga ggagggtaaa aaacttgttg ctgcaagtca agctgcctta 1920
ggcttataa 1929

	<210> 277		
	<211> 96		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 277		
	agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggaggg gcatggaccg gatcagctcc	60	
	tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat	96	
	<210> 278		
	<211> 96		
	<212> DNA		
10	<213> Homo sapiens		
	<400> 278		
	agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggaggg gcatggaccg gatcagctcc	60	
	tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat	96	
	<210> 279		
	<211> 96		
15	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 279		
	agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggaggg gcatggaccg gatcagctcc	60	
	tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat	96	
	<210> 280		
20	<211> 96		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 280		
	agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggaggg gcatggaccg gatcagctcc	60	
	tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat	96	
25	<210> 281		
	<211> 912		
	<212> DNA		
	<213> Rattus norvegicus		
	<400> 281		
	atggcccatt accatgacga ctatggaaag aatgatgaag tggagtttgt ccgaactggc	60	
	tatgggaagg acatgggtcaa agttctccat attcagaggg atggaaaata ccacagcatc	120	
	aaagaggtgg cgacttcggt gcagttgact ctgaggtcca aaaaggatta cctccatggt	180	
	gataattccg acatcatccc cacagacacc atcaagaaca cagtgcattgt cctggcgaag	240	
	ttcaaaggga tcaaaagcat cgagaccttc gctatgaaca tctgcgagca ctccctctct	300	
	tccttttagcc atgtcacccg agcccatgtc tacgtggaag aggtcccctg gaagcgtttt	360	
	gaaaagaatg gagtcaaaca cgtccatgcc ttcattccaca ccccgacggg aactcacttc	420	
	tgtgacgtgg agcaggtgag gaacggacct cccatcattc actctggaat caaagacctc	480	
	aaggtcctga aaacaaccca gtctggattt gaaggattca tcaaggacca gttcactact	540	
	ctccccgagg tgaaggaccg atgctttgccc actcaagtgt actgcaagtg gcgctaccag	600	
	aatcgggacg tggatttcga ggctacctgg ggcgctgtcc gggacattgt cctgaagaaa	660	
	tttgctgggc cctatgacag aggtgaatac tcaccttcgg tgcagaagac cctctatgac	720	
	atacaagtgc tgacctgag ccagcttcct gagatagaag acatggaaat cagccttcca	780	
	aacattcact actttaacat cgacatgtcc aaaatggggc tgatcaacaa ggaagaggtt	840	
	ttgctgcctc tggacaaccc ctacggcaaa ataaccggga cggtagggag gaagctgcct	900	
30	tccaggctgt ga	912	
	<210> 282		
	<211> 912		
	<212> DNA		
	<213> Rattus norvegicus		
35	<400> 282		

atggccatt	accatgacga	ctatggaaa	aatgatgaag	tggagttt	ccgaactggc	60
tatgggaagg	acatgggtcaa	agttctccat	attcagaggg	atggaaaata	ccacagcatc	120
aaagaggtgg	cgacttcggt	gcagttgact	ctgaggtcca	aaaaggatta	cctccatggt	180
gataattccg	acatcatccc	cacagacacc	atcaagaaca	cagtgcattg	cctggcgaag	240
ttcaaaggga	tcaaaagcat	cgagaccttc	gctatgaaca	tctgcgagca	cttcctctct	300
tccttttagcc	atgtcacccg	agcccatgtc	tacgtggaag	aggtcccttg	gaagcgtttt	360
gaaaagaatg	gagtcaaaca	cgcccatgcc	ttcatccaca	ccccgacggg	aactcaactc	420
tgtgacgtgg	agcaggtgag	gaacggacct	cccatcattc	actctggaat	caaagacctc	480
aaggtcttga	aaacaaccca	gtctggattt	gaaggattca	tcaaggacca	gttcactact	540
ctccccgagg	tgaaggaccg	atgctttgcc	actcaagtgt	actgcaagtg	gcgctaccag	600
aatcgggacg	tggatttcga	ggctacctgg	ggcgctgtcc	gggacattgt	cctgaagaaa	660
tttgctgggc	cctatgacag	aggtgaatac	tcaccttcgg	tgcagaagac	cctctatgac	720
atacaagtgc	tgacctgag	ccagcttccg	acatggaaat	cagccttcca	780	
aacattcact	actttaacat	cgacatgtcc	aaaatggggc	tgatcaacaa	ggaagaggtt	840
ttgctgcctc	tggacaaccc	ctacggcaaa	ataaccggga	cggtgaggag	gaagctgcct	900

tccaggctgt ga 912

5 <210> 283
 <211> 1233
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma arginini

<400> 283

atgtctgtat	ttgacagtaa	atttaaagga	attcacgttt	attcagaaat	tggatgaatta	60
gaatcagttc	tagttcacga	accaggacgc	gaaattgact	atattacacc	agctagacta	120
gatgaattat	tattctcagc	tatcttagaa	agccacgatg	ctagaaaaga	acacaaacaa	180
ttcgtagcag	aattaaaagc	aaacgacatc	aatgttgttg	aattaattga	tttagttgct	240
gaaacatatg	atttagcatc	acaagaagct	aaagataaat	taatcgaaga	atttttagaa	300
gactcagaac	cagttctatc	agaagaacac	aaagtagttg	taagaaactt	cttaaaagct	360
aaaaaaacat	caagaaaatt	agtagaaatc	atgatggcag	ggatcacaaa	atacgattta	420
ggatcgaag	cagatcacga	attaatcgtt	gacccaatgc	caaacctata	cttcacacgt	480
gacccatttg	catcagtagg	taatgggtga	acaatccact	acatgcgtta	caaagttaga	540
caacgtgaaa	cattattctc	aagatttgta	ttctcaaate	accctaaact	aattaacact	600
ccatggtact	acgaccttcc	actaaaatta	tcaatcgaag	gtggagacgt	atttatctac	660
aacaatgaca	catttagtagt	tgggtgttct	gaaagaactg	acttacaaac	agttacttta	720
ttagctaaaa	acattgtttg	taataaagaa	tgtgaattca	aacgtattgt	tgcaattaac	780
gttccaaaat	ggacaaaactt	aatgcactta	gacacatggc	taacaatggt	agacaaggac	840
aaatttcctat	actcaccaat	cgctaacgac	gtattttaaat	tctgggatta	tgacttagta	900
aacggtggag	cagaaccaca	accagttgaa	aacggattac	ctctagaagg	attattacaa	960
tcaatcatta	acaaaaaacc	agtttttaatt	cctatcgcag	gtgaagggtgc	ttcacaaatg	1020
gaaatcgaaa	gagaaacaca	cttcgatggt	acaaactact	tagcaattag	accaggtggt	1080
gtaattgggt	actcacgtaa	cgaaaaaaca	aacgctgctc	tagaagctgc	aggcattaaa	1140
gttcttccat	tccacggtaa	ccaattatca	ttaggtatgg	gtaacgctcg	ttgtatgtca	1200
atgcctttat	cacgtaaaga	tgtaaagtgg	tag			1233

10 <210> 284
 <211> 1233
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma arginini

<400> 284

```

atgtctgtat ttgacagtaa atttaaagga attcacgttt attcagaaat tgggtgaatta 60
gaatcagttc tagttcacga accaggacgc gaaattgact atattacacc agctagacta 120
gatgaattat tattctcagc tatcttagaa agccacgatg ctagaaaaga acacaaacaa 180
ttcgtagcag aattaaaagc aaacgacatc aatgttgttg aattaattga tttagttgct 240
gaaacatatg atttagcatc acaagaagct aaagataaat taatcgaaga atttttagaa 300
gactcagaac cagttctatc agaagaacac aaagtagttg taagaaactt cttaaaagct 360
aaaaaaacat caagaaaatt agtagaaatc atgatggcag ggatcacaaa atacgattta 420
ggtatcgaag cagatcacga attaatcgtt gacccaatgc caaacctata cttcacacgt 480
gaccatttg catcagtagg taatgggtga acaatccact acatgcgtta caaagttaga 540
caacgtgaaa cattattctc aagatttcta ttctcaaatc accctaaact aattaacact 600
ccatggtact acgacccttc actaaaatta tcaatcgaag gtggagacgt atttatctac 660
aacaatgaca cattagtagt tgggtgttct gaaagaactg acttacaaac agttacttta 720
ttagctaaaa acattgttgc taataaagaa tgtgaattca aacgtattgt tgcaattaac 780
gttccaaaat ggacaaactt aatgcactta gacacatggc taacaatggt agacaaggac 840
aaattcctat actcaccaat cgctaacgac gtattttaa tctgggatta tgacttagta 900
aacggtggag cagaaccaca accagttgaa aacggattac ctctagaagg attattacaa 960
tcaatcatta acaaaaaacc agttttaatt cctatcgag gtgaagggtgc ttcacaaatg 1020
gaaatcgaaa gagaaacaca cttcgatggt acaaaactact tagcaattag accaggtggt 1080
gtaattgggt actcacgtaa cgaaaaaaca aacgctgctc tagaagctgc aggcattaaa 1140
gttcttccat tccacggtaa ccaattatca ttaggtatgg gtaacgctcg ttgtatgtca 1200
atgcctttat cacgtaaaga tgtaagtgg tag 1233

```

<210> 285

<211> 1233

<212> DNA

5 <213> Mycoplasma arginini

<400> 285

```

atgtctgtat ttgacagtaa atttaaagga attcacgttt attcagaaat tgggtgaatta 60
gaatcagttc tagttcacga accaggacgc gaaattgact atattacacc agctagacta 120
gatgaattat tattctcagc tatcttagaa agccacgatg ctagaaaaga acacaaacaa 180
ttcgtagcag aattaaaagc aaacgacatc aatgttgttg aattaattga tttagttgct 240
gaaacatatg atttagcatc acaagaagct aaagataaat taatcgaaga atttttagaa 300
gactcagaac cagttctatc agaagaacac aaagtagttg taagaaactt cttaaaagct 360
aaaaaaacat caagaaaatt agtagaaatc atgatggcag ggatcacaaa atacgattta 420
ggtatcgaag cagatcacga attaatcgtt gacccaatgc caaacctata cttcacacgt 480
gaccatttg catcagtagg taatgggtga acaatccact acatgcgtta caaagttaga 540
caacgtgaaa cattattctc aagatttcta ttctcaaatc accctaaact aattaacact 600
ccatggtact acgacccttc actaaaatta tcaatcgaag gtggagacgt atttatctac 660
aacaatgaca cattagtagt tgggtgttct gaaagaactg acttacaaac agttacttta 720
ttagctaaaa acattgttgc taataaagaa tgtgaattca aacgtattgt tgcaattaac 780
gttccaaaat ggacaaactt aatgcactta gacacatggc taacaatggt agacaaggac 840
aaattcctat actcaccaat cgctaacgac gtattttaa tctgggatta tgacttagta 900
aacggtggag cagaaccaca accagttgaa aacggattac ctctagaagg attattacaa 960
tcaatcatta acaaaaaacc agttttaatt cctatcgag gtgaagggtgc ttcacaaatg 1020
gaaatcgaaa gagaaacaca cttcgatggt acaaaactact tagcaattag accaggtggt 1080
gtaattgggt actcacgtaa cgaaaaaaca aacgctgctc tagaagctgc aggcattaaa 1140
gttcttccat tccacggtaa ccaattatca ttaggtatgg gtaacgctcg ttgtatgtca 1200
atgcctttat cacgtaaaga tgtaagtgg tag 1233

```

<210> 286

<211> 1233

<212> DNA

10 <213> Mycoplasma arginini

<400> 286

atgtctgtat	ttgacagtaa	atttaaagga	attcacgttt	attcagaaat	tggtgaatta	60
gaatcagttc	tagttcacga	accaggacgc	gaaattgact	atattacacc	agctagacta	120
gatgaattat	tattctcagc	tatcttagaa	agccacgatg	ctagaaaaga	acacaaacaa	180
ttcgtagcag	aattaaaagc	aaacgacatc	aatgttggtg	aattaattga	tttagttgct	240
gaaacatatg	atttagcatc	acaagaagct	aaagataaat	taatcgaaga	atttttagaa	300
gactcagaac	cagttctatc	agaagaacac	aaagtagttg	taagaaactt	cttaaagct	360
aaaaaaacat	caagaaaatt	agtagaaatc	atgatggcag	ggatcacaaa	atacgattta	420
ggtatcgaag	cagatcacga	attaatcgtt	gacccaatgc	caaacctata	cttcacacgt	480
gacccatttg	catcagtagg	taatgggtga	acaatccact	acatgctgta	caaagttaga	540
caacgtgaaa	cattattctc	aagatttgta	ttctcaaatc	accctaaact	aattaacact	600
ccatggtact	acgacccttc	actaaaatta	tcaatcgaag	gtggagacgt	atttatctac	660
aacaatgaca	cattagtagt	tggtgtttct	gaaagaactg	acttacaaac	agttacttta	720
ttagctaaaa	acattgttgc	taataaagaa	tgtgaattca	aacgtattgt	tgcaattaac	780
gttccaaaat	ggacaaactt	aatgcactta	gacacatggc	taacaatggt	agacaaggac	840
aaattcctat	actcaccaat	cgctaacgac	gtattttaat	tctgggatta	tgacttagta	900
aacggtggag	cagaaccaca	accagttgaa	aacggattac	ctctagaagg	attattacaa	960
tcaatcatta	acaaaaaacc	agttttaatt	cctatcgcat	gtgaagggtg	ttcacaatg	1020
gaaatcgaaa	gagaaacaca	cttcgatggt	acaaactact	tagcaattag	accaggtggt	1080
gtaattgggt	actcacgtaa	cgaaaaaaca	aacgctgctc	tagaagctgc	aggcattaaa	1140
gttcttccat	tccacggtaa	ccaattatca	ttaggtatgg	gtaacgctcg	ttgtatgtca	1200
atgcctttat	cacgtaaaga	tgtaaagtgg	tag			1233

<210> 287

<211> 390

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 287

atggctcggg	gctcgtgctg	ccggttgctg	cggtctctcg	tgctggggct	ctggctggcg	60
ttgctgcgct	ccgtggccgg	ggagcaagcg	ccaggcaccg	ccccctgctc	ccgcggcagc	120
tcctggagcg	cggacctgga	caagtgcctg	gactgcgctg	cttgacgggc	gcgaccgcac	180
agcgacttct	gcctgggctg	cgctgcagca	cctctcgccc	ccttcgggct	gctttggccc	240
atccttgggg	gcgctctgag	cctgaccttc	gtgctggggc	tgctttctgg	ctttttggtc	300
tggagacgat	gccgcaggag	agagaagtgc	accaccccca	tagaggagac	cggcggagag	360
ggctgcccag	ctgtggcgct	gatccagtga				390

10 <210> 288

<211> 1494

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 288

gcccggccct	gcacccctaa	aagcttcggc	tacagctcgg	tggtgtgtgt	ctgcaatgcc	60
acatactgtg	actcctttga	ccccccgacc	tttctgccc	ttgttacctt	cagccgctat	120
gagagtacac	gcagtggggc	acggatggag	ctgagtatgg	ggcccatcca	ggctaatac	180
acgggacacg	ccctgctact	gacctgcag	ccagaacaga	agttccagaa	agtgaaggga	240
tttgaggggg	ccatgacaga	tgctgctgct	ctcaacatcc	ttgccctgtc	acccctgccc	300
caaaatttgc	tacttaaatc	gtactttctc	gaagaaggaa	tcggatataa	catcatccgg	360
gtacccatgg	ccagctgtga	cttctccatc	cgcacctaca	cctatgcaga	caccctgat	420
gattttccagt	tgcaacaactt	cagcctccca	gaggaagata	ccaagctcaa	gataccctg	480
attcaccag	ccctgcagtt	ggcccagcgt	cccgtttcac	tccttgccag	cccctggaca	540
tcacccactt	gcctcaagat	caatggagcg	gtgaattggg	aggggtcact	caagggacag	600
cccgagacac	tctaccacca	gacctggggc	agatactttg	tgaagtctct	ggatgcctat	660
gctgagcaca	agttacagtt	ctgggcagtg	acagctgaaa	atgagccttc	tgctgggctg	720
ttgagtggat	accccttcca	gtgcctgggc	ttcaccctg	aacatcagcg	agacttcatt	780
gcccgtgacc	taggtctctac	cctcgccaac	agtactcacc	acaatgtccg	cctactcatg	840
ctggatgacc	aacgcttgct	gctgccccac	tgggcaaagg	tggtactgac	agaccagaa	900
gcagctaaat	atgttcatgg	cattgctgta	catttggtacc	tggactttct	ggctccagcc	960
aaagccaccc	taggggagac	acaccgcctg	ttcccaaca	ccatgctctt	tgcttcagag	1020
gcctgtgtgg	gctccaagtt	ctgggagcag	agtgtgcggc	taggtctctg	ggatcgaggg	1080
atgcagtaca	cccacagcat	catcacgaac	ctcctgtacc	atgtggtcgg	ctggaccgac	1140
tggaaacctg	ccctgaaccc	cgaaggagga	cccaattggg	tgctgaactt	tgctgcacgt	1200
cccatcattg	tagacatcac	caaggacacg	ttttacaaac	agcccatggt	ctaccacctt	1260
ggccacttca	gcaagttcat	tcctgagggc	tcccagagag	tggggctggg	tgccagtcag	1320
aagaacgacc	tggacgcagt	ggcactgatg	caccgccgatg	gctctgctgt	tgtggtcgtg	1380
ctaaaccgct	cctctaagga	tgtgcctctt	accatcaagg	atcctgctgt	gggcttctctg	1440
gagacaatct	cacctggcta	ctccattcac	acctacctgt	ggcatcgcca	gtga	1494

<210> 289

<211> 1494

<212> DNA

15

<213> Homo sapiens

<400> 289

gccccgccct	gcatccctaa	aagcttcggc	tacagctcgg	tgggtgtgtgt	ctgcaatgcc	60
acatactgtg	actcctttga	ccccccgacc	tttcctgccc	ttggtacctt	cagccgctat	120
gagagtacac	gcagtgggcg	acggatggag	ctgagtatgg	ggcccatcca	ggctaatac	180
acgggcacag	gcctgctact	gacctgcag	ccagaacaga	agttccagaa	agtgaaggga	240
tttgaggggg	ccatgacaga	tgtgtgtgct	ctcaacatcc	ttgccctgtc	accccctgcc	300
caaaatttgc	tacttaaadc	gtactttctc	gaagaaggaa	tcggatataa	catcatccgg	360
gtacccatgg	ccagctgtga	cttctccatc	cgcacctaca	cctatgcaga	cacccctgat	420
gattttccagt	tgcacaactt	cagcctccca	gaggaagata	ccaagctcaa	gataccccctg	480
attcaccgag	ccctgcagtt	ggcccagcgt	cccgtttcac	tccttgccag	cccctggaca	540
tcacccactt	ggctcaagac	caatggagcg	gtgaatggga	aggggtcact	caagggacag	600
cccgagagaca	tctaccacca	gacctgggcc	agataactttg	tgaagtccct	ggatgcctat	660
gctgagcaca	agttacagtt	ctgggcagtg	acagctgaaa	atgagccttc	tgtgtggctg	720
ttgagtggat	accctttcca	gtgcctgggc	ttcaccctcg	aacatcagcg	agacttcatt	780
gcccgtgacc	taggtccctac	cctcgccaac	agtactcacc	acaatgtccg	cctactcatg	840
ctggatgacc	aacgcttgct	gctgccccac	tgggcaaagg	tgggtactgac	agaccacagaa	900
gcagctaaat	atgttcatgg	cattgctgta	catttggtacc	tggactttct	ggctccagcc	960
aaagccaccc	taggggagac	acaccgcctg	ttccccaaaca	ccatgctctt	tgcctcagag	1020

gcctgtgtgg	gctccaagtt	ctgggagcag	agtgtgcggc	taggctcctg	ggatcgaggg	1080
atgcagtaca	gccacagcat	catcacgaac	ctcctgtacc	atgtggtcgg	ctggaccgac	1140
tggaaacctg	cctgaaccc	cgaaggagga	cccaattggg	tgcgtaactt	tgtcgacagt	1200
cccatcattg	tagacatcac	caaggacacg	ttttacaaac	agcccatgtt	ctaccacctt	1260
ggccacttca	gcaagttcat	tcctgagggc	tcccagagag	tggggctggg	tgccagtcag	1320
aagaacgacc	tggacgcagt	ggcactgatg	catcccgatg	gctctgctgt	tgtggtcgtg	1380
ctaaaccgct	cctctaagga	tgtgcctctt	accatcaagg	atcctgctgt	gggcttccctg	1440
gagacaatct	cacctggcta	ctccattcac	acctacctgt	ggcatcgcca	gtga	1494

<210> 290

<211> 1494

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 290

gccccgccct	gcatccctaa	aagcttcggc	tacagctcgg	tgggtgtgtgt	ctgcaatgcc	60
acatactgtg	actcctttga	ccccccgacc	tttcctgccc	ttggtacctt	cagccgctat	120
gagagtacac	gcagtgggcg	acggatggag	ctgagtatgg	ggcccatcca	ggctaatac	180
acgggcacag	gcctgctact	gacctgcag	ccagaacaga	agttccagaa	agtgaaggga	240
tttgaggggg	ccatgacaga	tgtgtgtgct	ctcaacatcc	ttgccctgtc	accccctgcc	300
caaaatttgc	tacttaaadc	gtactttctc	gaagaaggaa	tcggatataa	catcatccgg	360
gtacccatgg	ccagctgtga	cttctccatc	cgcacctaca	cctatgcaga	cacccctgat	420
gattttccagt	tgcacaactt	cagcctccca	gaggaagata	ccaagctcaa	gataccccctg	480
attcaccgag	ccctgcagtt	ggcccagcgt	cccgtttcac	tccttgccag	cccctggaca	540
tcacccactt	ggctcaagac	caatggagcg	gtgaatggga	aggggtcact	caagggacag	600
cccgagagaca	tctaccacca	gacctgggcc	agataactttg	tgaagtccct	ggatgcctat	660
gctgagcaca	agttacagtt	ctgggcagtg	acagctgaaa	atgagccttc	tgtgtggctg	720
ttgagtggat	accctttcca	gtgcctgggc	ttcaccctcg	aacatcagcg	agacttcatt	780
gcccgtgacc	taggtccctac	cctcgccaac	agtactcacc	acaatgtccg	cctactcatg	840
ctggatgacc	aacgcttgct	gctgccccac	tgggcaaagg	tgggtactgac	agaccacagaa	900
gcagctaaat	atgttcatgg	cattgctgta	catttggtacc	tggactttct	ggctccagcc	960
aaagccaccc	taggggagac	acaccgcctg	ttccccaaaca	ccatgctctt	tgcctcagag	1020
gcctgtgtgg	gctccaagtt	ctgggagcag	agtgtgcggc	taggctcctg	ggatcgaggg	1080
atgcagtaca	gccacagcat	catcacgaac	ctcctgtacc	atgtggtcgg	ctggaccgac	1140
tggaaacctg	cctgaaccc	cgaaggagga	cccaattggg	tgcgtaactt	tgtcgacagt	1200
cccatcattg	tagacatcac	caaggacacg	ttttacaaac	agcccatgtt	ctaccacctt	1260
ggccacttca	gcaagttcat	tcctgagggc	tcccagagag	tggggctggg	tgccagtcag	1320
aagaacgacc	tggacgcagt	ggcactgatg	catcccgatg	gctctgctgt	tgtggtcgtg	1380
ctaaaccgct	cctctaagga	tgtgcctctt	accatcaagg	atcctgctgt	gggcttccctg	1440
gagacaatct	cacctggcta	ctccattcac	acctacctgt	ggcatcgcca	gtga	1494

<210> 291

<211> 1494

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 291

		gccccgccct	gcatccctaa	aagcttcggc	tacagctcgg	tggtgtgtgt	ctgcaatgcc	60
		acatactgtg	actcctttga	cccccgacc	tttctgccc	ttggtacctt	cagccgctat	120
		gagagtacac	gcagtgggcg	acggatggag	ctgagtatgg	ggcccatcca	ggctaatac	180
		acgggacacg	gcctgctact	gacctgcag	ccagaacaga	agttccagaa	agtgaaggga	240
		tttgaggggg	ccatgacaga	tgctgctgct	ctcaacatcc	ttgccctgtc	acccccctgc	300
		caaaatttgc	tacttaaatac	gtactttctct	gaagaaggaa	tcggatataa	catcatccgg	360
		gtacctatgg	ccagctgtga	cttctccatc	cgcacctaca	cctatgcaga	cacctctgat	420
		gattttccagt	tgcacaactt	cagcctccca	gaggaagata	ccaagctcaa	gataccccctg	480
		attcaccgag	ccctgcagtt	ggcccagcgt	cccgtttcac	tccttgccag	cccctggaca	540
		tcaccctact	ggctcaagac	caatggagcg	gtgaatggga	aggggtcact	caagggacag	600
		cccgagacac	tctaccacca	gacctggggc	agatactttg	tgaagtccct	ggatgcctat	660
		gctgagcaca	agttacagtt	ctgggagcgt	acagctgaaa	atgagccttc	tgctgggctg	720
		ttgagtggat	acccccctcca	gtgcctgggc	ttcaccctctg	aacatcagcg	agacttcatt	780
		gccccgtgacc	taggtcctac	cctcgccaac	agtactcacc	acaatgtccg	cctactcatg	840
		ctggatgacc	aacgcttgct	gctgccccac	tgggcaaagg	tggtactgac	agaccagaa	900
		gcagctaaat	atgttcatgg	cattgctgta	catttggtacc	tggtactttct	ggctccagcc	960
		aaagccaccc	taggggagac	acaccgctg	ttccccaca	ccatgctctt	tgctcagag	1020
		gcctgtgtgg	gctccaagtt	ctgggagcag	agtgtgcggc	taggtcctctg	ggatcgaggg	1080
		atgcagtaca	gccacagcat	catcacgaac	ctcctgtacc	atgtggtcgg	ctggaccgac	1140
		tggaaccttg	ccctgaaccc	cgaaggagga	cccaattggg	tgctgaactt	tgctgacagt	1200
		cccatcattg	tagacatcac	caaggacacg	ttttacaaac	agcccatgtt	ctaccacctt	1260
		ggccacttca	gcaagttcat	tcctgagggc	tcccagagag	tggggctggg	tgccagtcag	1320
		aagaacgac	tggaagcag	ggcactgatg	catcccgatg	gctctgctgt	tgtggtcgtg	1380
		ctaaaccgct	cctctaagga	tgtgcctctt	accatcaagg	atcctgctgt	gggcttctctg	1440
		gagacaatct	cacctggcta	ctccattcac	acctacctgt	ggcatcgcca	gtga	1494
		<210> 292						
5		<211> 156						
		<212> DNA						
		<213> Homo sapiens						
		<400> 292						
		taccgccaga	gcatgaacaa	cttccagggc	ctccggagct	ttggctgccg	cttcgggacg	60
		tgcacggtgc	agaagctggc	acaccagatc	taccagttca	cagataagga	caaggacaac	120
		gtcgccccca	ggagcaagat	cagccccccag	ggctac			156
10		<210> 293						
		<211> 156						
		<212> DNA						
		<213> Homo sapiens						
		<400> 293						
		taccgccaga	gcatgaacaa	cttccagggc	ctccggagct	ttggctgccg	cttcgggacg	60
		tgcacggtgc	agaagctggc	acaccagatc	taccagttca	cagataagga	caaggacaac	120
15		gtcgccccca	ggagcaagat	cagccccccag	ggctac			156
		<210> 294						
		<211> 156						
		<212> DNA						
		<213> Homo sapiens						
20		<400> 294						
		taccgccaga	gcatgaacaa	cttccagggc	ctccggagct	ttggctgccg	cttcgggacg	60
		tgcacggtgc	agaagctggc	acaccagatc	taccagttca	cagataagga	caaggacaac	120
		gtcgccccca	ggagcaagat	cagccccccag	ggctac			156
		<210> 295						
		<211> 156						
		<212> DNA						
25		<213> Homo sapiens						
		<400> 295						
		taccgccaga	gcatgaacaa	cttccagggc	ctccggagct	ttggctgccg	cttcgggacg	60
		tgcacggtgc	agaagctggc	acaccagatc	taccagttca	cagataagga	caaggacaac	120
		gtcgccccca	ggagcaagat	cagccccccag	ggctac			156
		<210> 296						
		<211> 438						
30		<212> DNA						

<213> Homo sapiens

<400> 296

atgaactcac	tgggtttcttg	gcagctactg	cttttctctt	gtgccacca	ctttggggag	60
ccattagaaa	aggtggcctc	tgtggggaat	tctagacca	caggccagca	gctagaatcc	120
ctgggcctcc	tggcccccgg	ggagcagagc	ctgccgtgca	ccgagaggaa	gccagctgct	180

actgccaggc	tgagccgtcg	ggggacctcg	ctgtccccgc	ccccgagag	ctccggggagc	240
ccccagcagc	cgggcctgtc	cgccccccac	agccgccaga	tccccgcacc	ccagggcgcg	300
gtgctggtgc	agcgggagaa	ggacctgccc	aactacaact	ggaactcctt	cggcctgccc	360
ttcggcaagc	gggaggcggc	accagggaa	cacggcagaa	gcgctgggcg	gggctggggc	420
gcaggtgccc	ggcagtga					438

5

<210> 297

<211> 438

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 297

atgaactcac	tgggtttcttg	gcagctactg	cttttctctt	gtgccacca	ctttggggag	60
ccattagaaa	aggtggcctc	tgtggggaat	tctagacca	caggccagca	gctagaatcc	120
ctgggcctcc	tggcccccgg	ggagcagagc	ctgccgtgca	ccgagaggaa	gccagctgct	180
actgccaggc	tgagccgtcg	ggggacctcg	ctgtccccgc	ccccgagag	ctccggggagc	240
ccccagcagc	cgggcctgtc	cgccccccac	agccgccaga	tccccgcacc	ccagggcgcg	300
gtgctggtgc	agcgggagaa	ggacctgccc	aactacaact	ggaactcctt	cggcctgccc	360
ttcggcaagc	gggaggcggc	accagggaa	cacggcagaa	gcgctgggcg	gggctggggc	420
gcaggtgccc	ggcagtga					438

<210> 298

<211> 1041

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 298

atggctcggc	ctgggcagcg	ttggctcggc	aagtggcttg	tggcgatggt	cgtgtggggc	60
ctgtgccggc	tcgccacacc	gctggccaag	aacctggagc	ccgtatcctg	gagctccctc	120
aaccccaagt	tcctgagtgg	gaagggcttg	gtgatctatc	cgaaaatttg	agacaagctg	180
gacatcatct	gcccccgagc	agaagcaggg	cggccctatg	agtactacaa	gctgtacctg	240
gtgctggcctg	agcaggcagc	tgccctgtagc	acagttctcg	accccaacgt	gttgggtcacc	300
tgcaataggc	cagagcagga	aatacgcttt	accatcaagt	tccaggagtt	cagccccaac	360
tacatgggcc	tggagttcaa	gaagcaccat	gattactaca	ttacctcaac	atccaatgga	420
agcctggagg	ggctggaaaa	ccgggagggc	ggtgtgtgcc	gcacacgcac	catgaagatc	480
atcatgaagg	ttgggcaaga	tcccaatgct	gtgacgcctg	agcagctgac	taccagcagg	540
cccagcaagg	aggcagacaa	cactgtcaag	atggccacac	aggcccttg	tagtcggggc	600
tccttgggtg	actctgatgg	caagcatgag	actgtgaacc	aggaagagaa	gagtggccca	660
ggtgcaagtg	ggggcagcag	cggggaccct	gatggcttct	tcaactccaa	ggtggcattg	720
ttcgctggctg	tcggtgccgg	ttgcgtcatc	ttcctgtcta	tcatcatctt	cctgacggtc	780
ctactactga	agctacgcaa	gcggcaccgc	aagcacacac	agcagcgggc	ggctgccttc	840
tcgctcagta	ccctggccag	tcccaagggg	ggcagtgagg	cagcggggac	cgagccagc	900
gacatcatca	ttcccttacg	gactacagag	aacaactact	gccccacta	tgagaagggtg	960
agtggggact	acgggcaccc	tgtctacatc	gtccaagaga	tgccgcccc	gagcccgggc	1020
aacatctact	acaaggtctg	a				1041

<210> 299

<211> 1041

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 299

atggctcggc	ctgggcagcg	ttggctcggc	aagtggcttg	tggcgatggt	cgtgtggggc	60
ctgtgccggc	tcgccacacc	gctggccaag	aacctggagc	ccgtatcctg	gagctccctc	120
aaccccaagt	tcctgagtgg	gaagggcttg	gtgatctatc	cgaaaatttg	agacaagctg	180
gacatcatct	gcccccgagc	agaagcaggg	cggccctatg	agtactacaa	gctgtacctg	240
gtgctggcctg	agcaggcagc	tgccctgtagc	acagttctcg	accccaacgt	gttgggtcacc	300
tgcaataggc	cagagcagga	aatacgcttt	accatcaagt	tccaggagtt	cagccccaac	360
tacatggggc	tggagttcaa	gaagcaccat	gattactaca	ttacctcaac	atccaatgga	420
agcctggagg	ggctggaaaa	ccgggagggc	ggtgtgtgcc	gcacacgcac	catgaagatc	480
atcatgaagg	ttgggcaaga	tcccaatgct	gtgacgcctg	agcagctgac	taccagcagg	540

20

```

cccagcaagg aggcagacaa cactgtcaag atggccacac aggccccctgg tagtcggggc 600
tccctgggtg actctgatgg caagcatgag actgtgaacc aggaagagaa gagtggccca 660
ggtgcaagtg ggggcagcag cggggaccct gatggcttct tcaactccaa ggtggcattg 720
ttcgcggtcg tcggtgccgg ttgcgtcatc ttctgtctca tcatcatctt cctgacggtc 780
ctactactga agctacgcaa gcggcaccgc aagcacacac agcagcgggc ggctgccctc 840
tcgctcagta ccttgccag tcccaagggg ggcagtggca cagcgggcac cgagcccagc 900
gacatcatca ttcccttacg gactacagag aacaactact gccccacta tgagaagggtg 960
agtggggact acgggcaccc tgtctacatc gtccaagaga tgccgccccca gagccccggcg 1020
aacatctact acaagggtctg a 1041

```

<210> 300

<211> 390

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 300

```

atggctcggg gctcgctgcg ccggttgctg cggtctctcg tgctggggct ctggctggcg 60
ttgctgcgct ccgtggcccg ggagcaagcg ccaggcaccg ccccttgctc ccgcggcagc 120
tcctggagcg cggacctgga caagtgcacg gactgcgcgt cttgcagggc gcgaccgcac 180
agcgacttct ccctgggctg cgctgcagca cctcctgccc ccttcgggt gctttggccc 240
atccttgggg gcgctctgag cctgaccttc gtgctggggc tgctttctgg cttttgggtc 300
tgagagacgat gccgcaggag agagaagttc accaccccca tagaggagac cggcggagag 360
ggctgccag ctgtggcgct gatccagtga 390

```

<210> 301

<211> 741

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 301

```

atgctcgctc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcacg tgggtgcagc cctgggagca 60
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccagggtc ctgaagacc agtgggtggca 120
ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gacacaaac agctggtgca cagctttgct 240
gagggccagg accagggcag cgcttatgcc aaccgcacgg ccctcttctt ggacctgctg 300
gcacagggca acgcattcct gaggtgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc 360
acctgcttct tgagcatccg ggatttccgc agcgtgccc tgagcctgca ggtggccgct 420
ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcccgc aggggacacg 480
gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc taccctgagg ctgagggtgt ctggcaggat 540
gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600
ttgtttgatg tgacacagct cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc 660
ctggtgcgca acccctgctc gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag 720
cctatgacat tccccccaga g 741

```

<210> 302

15 <211> 1041

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 302

```

atggctcggc ctgggcagcg ttggctcggc aagtggcttg tggcgatggt cgtgtgggcg 60
ctgtgcccgc tcgccacacc gctggccaag aacctggagc cgtatcctg gagctccctc 120
aaccccaagt tcctgagtg gaagggttg gtgatctatc cgaaaatttg agacaagctg 180
gacatcatct cccccagc agaagcaggg cggccctatg agtactacaa gctgtacctg 240
gtgcggcctg agcaggcagc tgcctgtagc acagtctctg accccaacgt gttggtcacc 300
tgcaataggc cagagcagga aatacgcttt accatcaagt tccaggagtt cagccccaac 360
tacatgggcc tggagttaa gaagcaccat gattactaca ttacctcaac atccaatgga 420
agcctggagg ggctggaaaa ccgggagggc ggtgtgtgcc gcacacgcac catgaagatc 480
atcatgaagg ttgggcaaga tcccaatgct gtgacgctg agcagctgac taccagcagg 540
cccagcaagg aggcagacaa cactgtcaag atggccacac aggccccctg tagtcggggc 600
tccctgggtg actctgatgg caagcatgag actgtgaacc aggaagagaa gagtggccca 660

```

20

```

ggtgcaagtg ggggcagcag cggggaccct gatggcttct tcaactccaa ggtggcattg 720
ttcgcggtcg tcggtgccgg ttgcgtcatc ttctgtctca tcatcatctt cctgacggtc 780
ctactactga agctacgcaa gcggcaccgc aagcacacac agcagcgggc ggctgccctc 840
tcgctcagta ccttgccag tcccaagggg ggcagtggca cagcgggcac cgagcccagc 900
gacatcatca ttcccttacg gactacagag aacaactact gccccacta tgagaagggtg 960
agtggggact acgggcaccc tgtctacatc gtccaagaga tgccgccccca gagccccggcg 1020
aacatctact acaagggtctg a 1041

```

<210> 303

<211> 1041

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 303
atggctcggc ctgggcagcg ttggctcggc aagtggcttg tggcgatggt cgtgtgggcg 60
ctgtgcaggc tcgccacacc gctggccaag aacctggagc ccgtatcctg gagctccctc 120
aaccccaagt tcctgagtgga gaagggtctg gtgatctatc cgaaaattgg agacaagctg 180
gacatcatct gcccccagagc agaagcaggc cggccctatg agtactaca gctgtacctg 240
gtgcggcctg agcaggcagc tgccctgtagc acagttctcg accccaacgt gttgggtacc 300
tgcaataggc cagagcagga aatacgcttt accatcaagt tccaggagtt cagccccaac 360
tacatgggccc tggagttcaa gaagcaccat gattactaca ttacctcaac atccaatgga 420
agcctggagg ggctggaaaa ccgggagggc ggtgtgtgcc gcacacgcac catgaagatc 480
atcatgaagg ttgggcaaga tcccaatgct gtgacgcctg agcagctgac taccagcagg 540
cccagcaagg aggcagacaa cactgtcaag atggccacac aggccctgg tagtcggggc 600
tccctgggtg actctgatgg caagcatgag actgtgaacc aggaagagaa gagtggccca 660
ggtgcaagtg ggggcagcag cggggaccct gatggcttct tcaactccaa ggtggcattg 720
ttcgcggctg tcggtgcccg ttgcgtcatc ttctgtctca tcatcatctt cctgacggtc 780
ctactactga agctacgcaa gcggcaccgc aagcacacac agcagcgggc ggctggcctc 840
tcgctcagta ccctggccag tcccaagggg ggagtgaggc cagcgggcac cgagcccagc 900
gacatcatca ttcccttacg gactacagag aacaactact gccccacta tgagaagggtg 960
agtggggact acgggcaccc tgtctacatc gtccaagaga tgccgcccc aagccccggc 1020
aacatctact acaaggctctg a 1041

5 <210> 304
<211> 960
<212> DNA
<213> Pan troglodytes

<220>

10 <221> diferencia_misc
<222> (88) a (90)
<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<400> 304
atgcctgtgt ttctattgca gaatgatgag gtggagtttg tccgaactgg ctatgggaag 60
gatatagtaa aagtctctcca tattcagcga gatggaaaat atcacagcat taaagagggtg 120
gcaacttcag tgcaacttac tctaagttcc aaaaaagatt acctgcatgg agataattca 180
gacatcatcc ctacagacac catcaagaac acagttcatg tcttggcaaa gtttaaagaa 240
aatgaaccag caaacataga tggggctatg gaaaaagcat tttgtttctt tttacaaatc 300
aaaagcatag aagccttttg tgtgaatatt tgtgagcatt ttctttcttc ttttaaccat 360
gtaatccgag ctcaagtcta tgtggaagaa atcccttgga agcatcttga aaagaatgga 420
gttaagcatg tccatgcatt tattcacact cccactggaa cacacttcgg tgaagttgaa 480
cagctgagaa gtggacccca agtcatctat tctggaatca aagacctcaa gctcttgaaa 540
acaacacagt ctggatttga aggtttcatc aaggaccagt tcaactacct ccctgaggtt 600
tttaaatgca tgatgagaac gttacctcag tcttctttcc ctttatttca agtgctctcc 660
atgggcagca gcctgatgga caccattcgg gaccttgatc tggagaaatc tgctgggccc 720
tatgacaaaag atgaatactc gccctctgtg cagaagacc tctgtgatat ccagggtgctc 780
tccctgagcc gagttcctgc gatagaagat atggaaatca gcctgccaaa cattcactac 840
ttcaacatag acatgtccaa aatgggtctg atcaacaagg aagaggctct gctgccatta 900
gacaatccat atggaaaaat tactggtaca gtcaagaggga agttgtcttc aagactgtga 960

15 <210> 305
<211> 960
<212> DNA
<213> Pan troglodytes

<220>

20 <221> diferencia_misc
<222> (88) a (90)
<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<400> 305

atgcctgtgt	tttcattgca	gaatgatgag	gtggagtttg	tccgaactgg	ctatgggaag	60
gatatagtaa	aagttctcca	tattcagcga	gatggaaaat	atcacagcat	taaagaggtg	120
gcaacttcag	tgaacttac	tctaagttcc	aaaaaagatt	acctgcatgg	agataattca	180
gacatcatcc	ctacagacac	catcaagaac	acagttcatg	tcttggaaca	gtttaagaa	240
aatgaaccag	caaacataga	tggggctatg	gaaaaagcat	tttgtttctt	tttacaatc	300
aaaagcatag	aagccttttg	tgtgaatatt	tgtgagcatt	ttctttcttc	ttttaaccat	360
gtaatccgag	ctcaagtcta	tgtggaagaa	atcccttgga	agcatcttga	aaagaatgga	420
gttaagcatg	tccatgcatt	tattcacact	cccactggaa	cacacttcgg	tgaagttgaa	480
cagctgagaa	gtggacccca	agtcattcat	tctggaatca	aagacctcaa	gctcttgaaa	540
acaacacagt	ctggatttga	aggtttctac	aaggaccagt	tcactaccct	ccctgaggtt	600
tttaaatgca	tgatgagaac	gttacctcag	tcttctttcc	ctttatttca	agtgtctctc	660
atgggcagca	gcctgatgga	caccattcgg	gacctgtgca	tggagaaatc	tgctgggccc	720
tatgacaaag	atgaataact	gccctctgtg	cagaagacct	tctgtgatat	ccaggtgctc	780
tccttgagcc	gagttcctgc	gatagaagat	atggaaatca	gcctgccaaa	cattcactac	840
ttcaacatag	acatgtccaa	aatgggtctg	atcaacaagg	aagaggtctt	gctgccatta	900
gacaatccat	atggaaaaat	tactggtaca	gtcaagagga	agttgtcttc	aagactgtga	960

<210> 306

<211> 1186

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> diferencia_misc

<222> (310) a (312)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

10 <220>

<221> diferencia_misc

<222> (829) a (831)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<220>

15 <221> Característica miscelánea

<222> (1186)

<223> n = a, t, g o c

<400> 306

atggagaaat	tcatttggta	cctgggtgcat	ttgtacactg	aaatgaccaa	gtcttctccc	60
tcctgcccgc	tcgtggctag	ttgtcagacc	gtggcaaaag	aactggggga	gaacagcctc	120
ggttatggtc	caggccatta	tctgtctctt	gggtgcaggg	atgcttttgg	gtgtcccatg	180
ccaggcttgt	tccacctgct	ccaggatcag	atgattggtt	cccttcatac	agactcattg	240
cctaatgatg	aggtggagtt	tgtccgaact	ggctatggga	aggaaatggt	aaaagtcttc	300
catattcagc	gagatggaaa	atatcacagc	attaaagagg	tggcaacttc	agtgcacttc	360
actctaagtt	ccaaaaaaga	ttacctgcat	ggagataatt	cagacatcat	ccctacagac	420
accatcaaga	acacagttca	tgtcttggca	aagttttaaag	aaaatgaccc	agcaaacata	480
gatggggcta	tggaaaaagc	atthttgttc	ttttttacaa	tcaaaagcat	agaagccttt	540
ggtgtgaata	tttgtgagca	ttttctttct	tcttttaacc	atgtaatccg	agctcaagtc	600
tacatgggaag	aaatcccttg	gaagcatctt	ggaaagaatg	gagttaagca	tgtccatgca	660
tttatttcaca	ctcccactgg	aacacacttc	tgtgaagttg	aacagctgag	aagtggaccc	720

caagtcattc	attctggaat	caaagacctc	aaggtcttga	aaacaacaca	gtctggattt	780
gaaggtttca	tcaaggacca	gttcaactacc	ctccctgagg	tgaaggaccg	atgcttttgc	840
acccaagtgt	actgcaagtg	gcgctaccac	cagtgcaggg	atgtggactt	caaggctacc	900
tgggacacca	ttcgggacct	tgtcatggag	aaatctgctg	ggccctatga	caaagggtgaa	960
tacttgacct	ctgtgcagaa	gacctctgt	gatatccagg	tgtctctcct	gagccgagtt	1020
cctgcatag	aagatatgga	aatcagcctg	ccaaacattc	actacttcaa	catagacatg	1080
tccaaaatgg	gtctgatcaa	caaggaagag	gtcttgctgc	cattagacaa	tccatatgga	1140
aaaattactg	gtacagtcaa	gaggaagttg	tcttcaagac	tgtgan		1186

<210> 307

<211> 1186

<212> DNA

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> diferencia_misc

<222> (310) a (312)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

30 <220>

<221> diferencia_misc
<222> (829) a (831)
<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<220>

- 5 <221> Característica miscelánea
<222> (1186)
<223> n = a, t, g o c

<400> 307

atggagaaat	tcatttggta	cctgggtgcat	ttgtacactg	aaatgaccaa	gtctttctccc	60
tcctgcccgc	tcgtgggctag	ttgtcagacc	gtggcaaaaag	aactggggga	gaacagcctc	120
ggttatggtc	caggccatta	tctgctcttt	gggtgcaggg	atgcttttgg	gtgtcccatg	180
ccaggcttgt	tccacctgct	ccaggatcag	atgattgggt	cccttcatac	agactcattg	240
ccaaatgatg	agggtggagtt	tgctccgaact	ggctatggga	aggaaatggg	aaaagtcttc	300
catattcagc	gagatggaaa	atatcacagc	attaaagagg	tggcaacttc	agtgcgaactt	360
actctaagtt	ccaaaaaaga	ttacctgcat	ggagataatt	cagacatcat	ccctacagac	420
accatcaaga	acacagttca	tgtcttggca	aagtttaaaag	aaaatgaccc	agcaaacata	480
gatggggcta	tggaaaaagc	attttgtttc	tttttacaaa	tcaaaagcat	agaagccttt	540
gggtggaata	tttgtgagca	ttttctttct	tcttttaacc	atgtaatccg	agctcaagtc	600
tacatggaag	aaatcccttg	gaagcatctt	ggaaagaatg	gagttaagca	tgtccatgca	660
tttattcaca	ctcccactgg	aacacacttc	tgtgaagttg	aacagctgag	aagtggaccc	720
caagtcattc	attcttggat	caaagacctc	aaggtcttga	aaacaacaca	gtctggattt	780
gaaggtttca	tcaaggacca	gttccactac	ctccctgagg	tgaaggaccg	atgctttgcc	840
acccaagtgt	actgcaagtg	gcgctaccac	cagtgcaagg	atgtggactt	caaggctacc	900
tgggacacca	ttcgggacct	tgtcatggag	aaatctgctg	ggccctatga	caaaggtgaa	960
tacttgacct	ctgtgcagaa	gacctctctg	gatatccagg	tgtctctccc	gagccgagtt	1020
cctgcgatag	aagatatgga	aatcagcctg	ccaaacattc	actacttcaa	catagacatg	1080
tccaaaatgg	gtctgatcaa	caaggaagag	gtcttgctgc	cattagacaa	tccatatgga	1140
aaaattactg	gtacagtcaa	gaggaagttg	tcttcaagac	tgtgan		1186

- 10 <210> 308
<211> 927
<212> DNA
<213> Papio hamadryas

<220>

- 15 <221> Característica miscelánea
<222> (927)
<223> n = a, t, g o c

<400> 308

atggccgact	accataacaa	ctataaaaag	aatgatgaat	tggagtttgt	ccgaactggc	60
tatgggaagg	atatggtaaa	agttctccat	attcagcgag	atggaaaata	tcacagcatt	120
aaagaggtgg	caacttcagt	gcaacttact	ctgagttcca	aaaaagatta	cctgcatgga	180
gataattcag	atatcatccc	tacagacacc	atcaagaaca	cagttcatgt	cttggcaaaag	240
tttaagggaa	tcaaaagcat	agaagccttt	gggtggaata	tttgtgagta	ttttctttct	300
tcttttaacc	atgtaatccg	agctcaagtc	tacgtggaag	aaatcccttg	gaagcgtctt	360
gaaaagaatg	gagttaagca	tgtccatgca	tttattcaca	ctcccactgg	aacacacttc	420
tgtgaagttg	aacaactgag	aagtggaccc	cccgtcatta	cttctggaat	caaagacctc	480
aaggtcttga	aaacaacaca	gtctggattt	gaaggtttca	tcaaggacca	gttcaccacc	540
ctccctgagg	tgaaggaccg	atgctttgcc	acccaagtgt	actgcaagtg	gcgctaccac	600
cagtgcaagg	atgtggactt	cgaggctacc	tggggcacca	ttcgggacct	tgtcctggag	660
aaatttgctg	ggccctatga	caaaggcgag	tactcacctc	ctgtgcagaa	gacctcttat	720
gatatccagg	tgtctctccc	gagccgagtt	cctgagatag	aagatatgga	aatcagcctg	780
ccaaacattc	actacttcaa	tatagacatg	tccaaaatgg	gtctgatcaa	caaggaagag	840
gtcttgctgc	cattagacaa	tccatatgga	aaaattactg	gtacagtcaa	gaggaagttg	900
tcttcaagac	tgtgacattg	tggccan				927

- 20 <210> 309
<211> 927
<212> DNA
<213> Papio hamadryas

<220>

- 25 <221> Característica miscelánea
<222> (927)
<223> n = a, t, g o c

<400> 309

```

atggccgact accataacaa ctataaaaag aatgatgaat tggagtttgt ccgaactggc 60
tatgggaagg atatggtaaa agttctccat attcagcgag atggaaaata tcacagcatt 120
aaagaggtgg caacttcagt gcaacttact ctgagttcca aaaaagatta cctgcatgga 180
gataattcag atatcatccc tacagacacc atcaagaaca cagttcatgt cttggcaaag 240
tttaagggaa tcaaaagcat agaagccttt ggtgtgaata tttgtgagta tttctttct 300
tcttttaacc atgtaatccg agctcaagtc tacgtggaag aaatcccttg gaagcgtctt 360
gaaaagaatg gagttaagca tgtccatgca tttattcaca ctccactgg aacacacttc 420
tgtgaagttg aacaactgag aagtggaccc cccgtcatla cttctggaat caaagacctc 480
aaggtcttga aaacaacaca gtctggattt gaaggtttca tcaaggacca gtccaccacc 540
ctccctgagg tgaaggaccg atgctttgcc acccaagtgt actgcaagtg gcgctaccac 600
cagtgcaggg atgtggactt cgaggctacc tggggacca ttcgggacct tgtcctggag 660
aaatttgctg ggccctatga caaaggcgag tactcacctt ctgtgcagaa gaccctctat 720
gataaccagg tgctctccct gagccgagtt cctgagatag aagatatgga aatcagcctg 780
ccaaacattc actacttcaa tatagacatg tccaaaatgg gtctgatcaa caaggaagag 840
gtcttgctgc cattagacaa tccatatgga aaaattactg gtacagtcaa gaggaagttg 900
tcttcaagac tgtgacattg tggccan 927

```

<210> 310

<211> 1186

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> diferencia_misc

<222> (310) a (312)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

10 <220>

<221> diferencia_misc

<222> (829) a (831)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<220>

15 <221> Característica miscelánea

<222> (1186)

<223> n = a, t, g o c

<400> 310

```

atggagaaat tcatttggtg cctgggtgcat ttgtacactg aaatgaccaa gtctttctccc 60
tcctgcccgc tcgtggctag ttgtcagacc gtggcaaaaag aactggggga gaacagcctc 120
ggttatgggt caggccatta tctgctcttt ggggtgcaggg atgcttttgg gtgtcccatg 180
ccaggcttgt tccacctgct ccaggatcag atgattgggt cccttcatac agactcattg 240
ccaaatgatg aggtggagtt tgtccgaact ggctatggga aggaaatggg aaaagttctc 300
catattcagc gagatggaaa atatcacagc attaaagagg tggcaacttc agtgcaactt 360
actctaagtt ccaaaaaaga ttacctgcat ggagataatt cagacatcat ccctacagac 420
accatcaaga acacagttca tgtcttgga aagtttaaaag aaaaatgaccc agcaaacata 480
gatggggcta tggaaaaagc attttggttc tttttacaaa tcaaaagcat agaagccttt 540
ggtgtgaata tttgtgagca ttttctttct tcttttaacc atgtaatccg agctcaagtc 600
tacatggaag aaatcccttg gaagcatctt ggaaagaatg gagttaagca tgtccatgca 660
tttattcaca ctcccactgg aacacacttc tgtgaagttg aacagctgag aagtggaccc 720
caagtcattc attctggaat caaagacctc aaggtcttga aaacaacaca gtctggattt 780
gaaggtttca tcaaggacca gtccactacc ctccctgagg tgaaggaccg atgctttgcc 840
acccaagtgt actgcaagtg gcgctaccac cagtgcaggg atgtggactt caaggctacc 900
tgggacacca ttcgggacct tgctatggag aaatctgctg ggccctatga caaagggtgaa 960
tacttgacct ctgtgcagaa gacctctgt gatattccagg tgctctccct gagccgagtt 1020
cctgcgatag aagatatgga aatcagcctg ccaaacattc actacttcaa catagacatg 1080
tccaaaatgg gtctgatcaa caaggaagag gtcttgctgc cattagacaa tccatatgga 1140
aaaattactg gtacagtcaa gaggaagttg tcttcaagac tgtgan 1186

```

20 <210> 311

<211> 960

<212> DNA

<213> Pan troglodytes

<220>

25 <221> diferencia_misc

<222> (88) a (90)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<400> 311

```

atgcctgtgt tttcattgca gaatgatgag gtggagtttg tccgaactgg ctatgggaag    60
gatatagtaa aagttctcca tattcagcga gatggaaaat atcacagcat taaagagggtg    120
gcaacttcag tgcaacttac tctaagttcc aaaaaagatt acctgcatgg agataattca    180
gacatcatcc ctacagacac catcaagaac acagttcatg tcttggcaaa gtttaaagaa    240
aatgaaccag caaacataga tggggctatg gaaaaagcat tttgtttctt tttaaaaatc    300
aaaagcatag aagccttttg tgtgaatatt tgtgagcatt ttctttcttc tttaaacat    360
gtaatccgag ctcaagtcta tgtggaagaa atcccttgga agcatcctga aaagaatgga    420
gttaagcatg tccatgcatt tattcacact cccactggaa cacacttcgg tgaagttgaa    480
cagctgagaa gtggacccca agtcattcat tctggaatca aagacctcaa gctcttgaaa    540
acaacacagt ctggatttga aggtttcatc aaggaccagt tcaactacct ccctgagggt    600
tttaaatgca tgatgagaac gttacctcag tcttcttctc ctttatttca agtgctctcc    660
atgggcagca gcctgatgga caccattcgg gaccttgta tggagaaatc tgcctggccc    720
tatgacaaag atgaatactc gccctctgtg cagaagacc tctgtgatat ccagggtgct    780
tccttgagcc gaggctcctgc gatagaagat atggaaatca gcctgccaaa cattcactac    840
ttcaacatag acatgtccaa aatgggtctg atcaacaagg aagaggctct gctgccatta    900
gacaatccat atggaaaaat tactggtaca gtcaagagga agttgtcttc aagactgtga    960

```

<210> 312

<211> 927

<212> DNA

5 <213> Papio hamadryas

<220>

<221> Característica miscelánea

<222> (927)

<223> n = a, t, g o c

10 <400> 312

```

atggccgact accataacaa ctataaaaag aatgatgaat tggagtttgt ccgaactggc    60
tatgggaagg atatggtaaa agttctccat attcagcgag atggaaaata tcacagcatt    120
aaagagggtg caacttcagt gcaacttact ctgagttcca aaaaagatta cctgcatgga    180
gataattcag atatcatccc tacagacacc atcaagaaca cagttcatgt cttggcaaa    240
tttaagggaa tcaaaagcat agaagccttt ggtgtgaata tttgtgagta ttttctttct    300
tcttttaacc atgtaatccg agctcaagtc tacgtggaag aaatcccttg gaagcgtctt    360
gaaaagaatg gagttaagca tgtccatgca tttattcaca ctcccactgg aacacacttc    420
tgtgaagtgt aacaactgag aagtggaccc cccgtcatta cttctggaat caaagacctc    480
aagggtctga aaacaacaca gtctggattt gaagggttca tcaaggacca gttcaccacc    540
ctccctgagg tgaaggaccg atgctttgcc acccaagtgt actgcaagtg gcgctaccac    600
cagtgccagg atgtggactt cgaggctacc tggggcacca ttcgggacct tgtcctggag    660
aaatttgctg ggccctatga caaaggcgag tactcacctc ctgtgcagaa gaccctctat    720
gatatecagg tgctctccct gagccgagtt cctgagatag aagatatgga aatcagcctg    780
ccaaacattc actacttcaa tatagacatg tccaaaatgg gtctgatcaa caaggaagag    840
gtcttgctgc cattagacaa tccatatgga aaaattactg gtacagtcaa gaggaagttg    900
tcttcaagac tgtgacattg tggccan

```

<210> 313

<211> 805

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 313

ES 2 567 634 T3

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

Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala
 180 185 190
 Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu
 195 200 205
 Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys
 210 215 220
 Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe
 225 230 235 240
 Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu
 245 250 255
 Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr
 260 265 270
 Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp
 275 280 285
 Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu
 290 295 300
 Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala
 305 310 315 320
 Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala
 325 330 335
 Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
 340 345 350
 Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro
 355 360 365
 Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr
 370 375 380
 Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala
 385 390 395 400
 Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu
 405 410 415
 Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
 420 425 430
 Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
 435 440 445
 Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser
 450 455 460
 Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
 465 470 475 480
 Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
 485 490 495
 Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn

ES 2 567 634 T3

500					505					510					
Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro
	515						520					525			
Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr
	530					535					540				
Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu
545					550					555					560
Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val
				565					570					575	
Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp
			580					585					590		
Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser
		595					600					605			
Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe
	610					615					620				
Asp	Asn	Ala	Met	Leu	Arg	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Phe	Asp
625					630					635					640
Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys	Glu	Gln	Lys	Tyr
				645					650					655	
Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro	Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile
			660					665					670		
Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu
		675					680					685			
Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val
	690					695					700				
Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser
705					710					715					720
Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	Ile	Gln
				725					730					735	
Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Ile
			740					745					750		
Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser	Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp
		755					760					765			
Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	Asp	Met
	770					775					780				
Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Glu
785					790					795					800
Gly	Ser	Cys	Gly	Phe											
				805											

<210> 314

<211> 795

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 314

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1 5 10 15
 Ile Ser Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp
 20 25 30
 Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln
 35 40 45
 Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu
 50 55 60
 Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn
 65 70 75 80
 Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val
 85 90 95
 Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys
 100 105 110
 Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn
 115 120 125
 Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr
 130 135 140
 Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu
 145 150 155 160
 Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe
 165 170 175
 Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp
 180 185 190
 Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly
 195 200 205
 Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys
 210 215 220
 Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln
 225 230 235 240
 Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp
 245 250 255
 Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys
 260 265 270
 Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp
 275 280 285
 Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu

ES 2 567 634 T3

290	295	300
Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp 305 310 315 320		
Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys 325 330 335		
Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu 340 345 350		
Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu 355 360 365		
Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp 370 375 380		
Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val 385 390 395 400		
Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln 405 410 415		
Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys 420 425 430		
Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn 435 440 445		
Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg 450 455 460		
Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys 465 470 475 480		
Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys 485 490 495		
Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val 500 505 510		
Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe 515 520 525		
His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys 530 535 540		
Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys 545 550 555 560		
Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys 565 570 575		
Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys 580 585 590		
Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Phe Pro Thr Ile 595 600 605		
Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu 610 615 620		

ES 2 567 634 T3

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

<210> 315

<211> 793

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 315

Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Ser Leu Ala Asn
 1 5 10 15
 Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly
 20 25 30
 Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu
 35 40 45
 Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr
 50 55 60
 Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp
 65 70 75 80
 Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr
 85 90 95
 Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu

ES 2 567 634 T3

100					105					110					
Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn
		115					120					125			
Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe
	130					135					140				
His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala
145					150					155					160
Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys
				165					170					175	
Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala
			180					185					190		
Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala
		195					200					205			
Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly
	210					215					220				
Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe
225				230						235					240
Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr
			245						250					255	
Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp
			260					265					270		
Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile
		275					280					285			
Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser
	290					295					300				
His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro
305				310						315					320
Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr
			325						330					335	
Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala
			340					345					350		
Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys
		355					360					365			
Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His
	370					375					380				
Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu
385				390					395						400
Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly
			405						410					415	
Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val
			420				425					430			

ES 2 567 634 T3

Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly
 435 440 445
 Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro
 450 455 460
 Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu
 465 470 475 480
 His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu
 485 490 495
 Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu
 500 505 510
 Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala
 515 520 525
 Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr
 530 535 540
 Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln
 545 550 555 560
 Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys
 565 570 575
 Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu
 580 585 590
 Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 595 600 605
 Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 610 615 620
 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 625 630 635 640
 Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 645 650 655
 Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 660 665 670
 Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 675 680 685
 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 690 695 700
 Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
 705 710 715 720
 Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
 725 730 735
 Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 740 745 750
 His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
 755 760 765
 Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
 770 775 780
 Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 785 790

<210> 316

<211> 800

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 567 634 T3

<400> 316

```

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1           5           10           15

Tyr Ser Gly Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
      20           25           30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
      35           40           45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
      50           55           60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
      65           70           75           80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
      85           90           95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
      100          105          110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
      115          120          125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
      130          135          140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
      145          150          155          160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
      165          170          175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
      180          185          190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
      195          200          205

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

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
      225          230          235          240

```

ES 2 567 634 T3

Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	
				245					250					255		
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	
				260				265					270			
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	
		275					280					285				
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	
	290					295					300					
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	
305					310					315					320	
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	
				325					330					335		
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	
			340					345					350			
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	
		355					360					365				
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	
	370					375					380					
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	
385					390					395					400	
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	
				405					410					415		
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	
			420					425					430			
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	
		435					440					445				
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	
	450					455					460					
Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	
465					470					475					480	
Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	
				485					490					495		
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	
			500					505					510			
Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	
		515					520					525				
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	
	530					535					540					
Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	
545					550					555					560	

ES 2 567 634 T3

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu
610 615 620

Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe
625 630 635 640

Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn
645 650 655

Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn
660 665 670

Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser
675 680 685

Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser
690 695 700

Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr
705 710 715 720

Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg
725 730 735

Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr
740 745 750

Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn
755 760 765

Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr
770 775 780

Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
785 790 795 800

<210> 317

<211> 774

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 317

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

ES 2 567 634 T3

Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	50	55	60
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	65	70	75
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	85	90	95
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	100	105	110
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	115	120	125
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	130	135	140
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	145	150	155
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	165	170	175
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	180	185	190
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	195	200	205
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	210	215	220
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	225	230	235
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	245	250	255
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	260	265	270
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	275	280	285
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	290	295	300
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	305	310	315
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	325	330	335
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	340	345	350
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	355	360	365

ES 2 567 634 T3

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
 610 615 620
 Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
 625 630 635 640
 Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
 645 650 655
 Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
 660 665 670
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
 675 680 685
 Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu

ES 2 567 634 T3

690 695 700
 Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
 705 710 715 720
 Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 725 730 735
 Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 740 745 750
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
 755 760 765
 Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 770

<210> 318

<211> 728

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 318

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

ES 2 567 634 T3

Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
195 200 205

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
210 215 220

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
225 230 235 240

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
245 250 255

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

Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
275 280 285

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
290 295 300

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
305 310 315 320

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
325 330 335

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg
340 345 350

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys
355 360 365

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
370 375 380

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
385 390 395 400

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
405 410 415

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
420 425 430

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
435 440 445

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
450 455 460

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
465 470 475 480

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
485 490 495

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
500 505 510

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln

ES 2 567 634 T3

515		520		525
Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr				
530		535		540
Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln				
545		550		555
Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val				
		565		570
Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala				
		580		585
Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu				
		595		600
Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu				
		610		615
Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr				
		625		630
Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile				
		645		650
Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu				
		660		665
Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys				
		675		680
Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala				
		690		695
Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala				
		705		710
Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu				
		725		

<210> 319

<211> 669

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 319

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Gly Ser Leu Asp Lys Arg His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser
20 25 30
Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala
35 40 45
Trp Leu Val Lys Gly Arg His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val
50 55 60
Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu

ES 2 567 634 T3

65	70	75	80
Val Lys Gly Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys	85	90	95
Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala	100	105	110
Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn	115	120	125
Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu	130	135	140
Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr	145	150	155
Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala	165	170	175
Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp	180	185	190
Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys	195	200	205
Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr	210	215	220
Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe	225	230	235
Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala	245	250	255
Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu	260	265	270
Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln	275	280	285
Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser	290	295	300
Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr	305	310	315
Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu	325	330	335
Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln	340	345	350
Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu	355	360	365
Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala	370	375	380
Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys	385	390	395
			400

ES 2 567 634 T3

Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 420 425 430
 Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 435 440 445
 Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 450 455 460
 Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 465 470 475 480
 Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 485 490 495
 Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 500 505 510
 Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 515 520 525
 Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 530 535 540
 Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 545 550 555 560
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 565 570 575
 Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 580 585 590
 Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 595 600 605
 Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 610 615 620
 Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 625 630 635 640
 Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 645 650 655
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 660 665

<210> 320

<211> 638

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 320

Met Lys Val Ser Val Ala Ala Leu Ser Cys Leu Met Leu Val Thr Ala

ES 2 567 634 T3

1	5	10	15
Leu Gly Ser Gln Ala Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe	20	25	30
Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys	35	40	45
Val Leu Arg Arg His Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe	50	55	60
Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe	65	70	75
Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val	85	90	95
Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala	100	105	110
Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys	115	120	125
Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys	130	135	140
Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp	145	150	155
Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met	165	170	175
Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu	180	185	190
Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu	195	200	205
Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala	210	215	220
Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp	225	230	235
Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu	245	250	255
Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu	260	265	270
Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val	275	280	285
Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu	290	295	300
Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn	305	310	315
Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu	325	330	335

ES 2 567 634 T3

```

Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
      340                      345                      350

Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
      355                      360                      365

Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
      370                      375                      380

Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
      385                      390                      395                      400

Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
      405                      410                      415

Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
      420                      425                      430

Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
      435                      440                      445

Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
      450                      455                      460

Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
      465                      470                      475                      480

Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
      485                      490                      495

Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
      500                      505                      510

Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
      515                      520                      525

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
      530                      535                      540

Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
      545                      550                      555                      560

Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
      565                      570                      575

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
      580                      585                      590

Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
      595                      600                      605

Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
      610                      615                      620

Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
      625                      630                      635

```

<210> 321

<211> 638

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 321

ES 2 567 634 T3

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Pro Met Val Trp Ala Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe
20 25 30

Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys
35 40 45

Val Leu Arg Arg His Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
50 55 60

Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe
65 70 75 80

Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val
85 90 95

Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
100 105 110

Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
115 120 125

Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
130 135 140

Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
145 150 155 160

Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met
165 170 175

Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu
180 185 190

Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
195 200 205

Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
210 215 220

Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
225 230 235 240

Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
245 250 255

Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
260 265 270

Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
275 280 285

Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
290 295 300

ES 2 567 634 T3

Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 305 310 315 320
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 325 330 335
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 340 345 350
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
 355 360 365
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 370 375 380
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
 385 390 395 400
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 405 410 415
 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 420 425 430
 Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 435 440 445
 Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 450 455 460
 Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 465 470 475 480
 Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
 485 490 495
 Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 500 505 510
 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
 515 520 525
 Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 530 535 540
 Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
 545 550 555 560
 Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
 565 570 575
 Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 580 585 590
 Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
 595 600 605
 Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
 610 615 620
 Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 625 630 635

<210> 322

<211> 666

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 322

ES 2 567 634 T3

Met	Lys	Val	Ser	Val	Ala	Ala	Leu	Ser	Cys	Leu	Met	Leu	Val	Thr	Ala	1	5	10	15
Leu	Gly	Ser	Gln	Ala	His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	20	25	30	
Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly	Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	35	40	45	
Lys	Gly	Arg	His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	50	55	60	
Leu	Glu	Gly	Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	65	70	75	80
Arg	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	85	90	95	
Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	100	105	110	
Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	115	120	125	
Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	130	135	140	
Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	145	150	155	160
Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	165	170	175	
Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	180	185	190	
Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	195	200	205	
His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	210	215	220	
Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	225	230	235	240
Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	245	250	255	
Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	260	265	270	

Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly
275 280 285

Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe
290 295 300

Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr
305 310 315 320

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

Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile
340 345 350

Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser
355 360 365

His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro
370 375 380

Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr
385 390 395 400

Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala
405 410 415

Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys
420 425 430

Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His
435 440 445

Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu
450 455 460

Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly
465 470 475 480

Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
485 490 495

Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly
500 505 510

Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro
515 520 525

Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu
530 535 540

His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu
545 550 555 560

Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu
565 570 575

Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala
580 585 590

Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr
595 600 605

Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln
610 615 620

Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys
625 630 635 640

Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu
645 650 655

Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
660 665

<210> 323
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 323
 Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
 20 25 30
 Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu
 35 40 45
 Gly Cys Lys Val Leu Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
 50 55 60
 Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
 65 70 75 80
 Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
 85 90 95
 Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met
 100 105 110
 Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu
 115 120 125
 Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
 130 135 140
 Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
 145 150 155 160
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
 165 170 175
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
 180 185 190
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 195 200 205

ES 2 567 634 T3

Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
 210 215 220
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 225 230 235 240
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 245 250 255
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 260 265 270
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 275 280 285
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
 290 295 300
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 305 310 315 320
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
 325 330 335
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 340 345 350
 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 355 360 365
 Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 370 375 380
 Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 385 390 395 400
 Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 405 410 415
 Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
 420 425 430
 Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 435 440 445
 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
 450 455 460
 Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 465 470 475 480
 Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
 485 490 495
 Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
 500 505 510
 Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 515 520 525
 Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
 530 535 540
 Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
 545 550 555 560
 Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 565 570

<210> 324

<211> 638

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 567 634 T3

<400> 324

```

Met Lys Val Ser Val Ala Ala Leu Ser Cys Leu Met Leu Val Thr Ala
 1              5              10              15

Leu Gly Ser Gln Ala Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe
      20              25              30

Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys
      35              40              45

Val Leu Arg Arg His Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
 50              55              60

Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe
 65              70              75              80

Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val
      85              90              95

Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
      100              105              110

Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
      115              120              125

Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
      130              135              140

Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
      145              150              155              160

Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met
      165              170              175

Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu
      180              185              190

Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
      195              200              205

Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
      210              215              220

Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
      225              230              235              240

```


ES 2 567 634 T3

Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
 245 250 255
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 260 265 270
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
 275 280 285
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 290 295 300
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 305 310 315 320
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 325 330 335
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 340 345 350
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
 355 360 365
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 370 375 380
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
 385 390 395 400
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 405 410 415
 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 420 425 430
 Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 435 440 445
 Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 450 455 460
 Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 465 470 475 480
 Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
 485 490 495
 Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 500 505 510
 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
 515 520 525
 Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 530 535 540
 Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
 545 550 555 560

ES 2 567 634 T3

Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
565 570 575
Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
580 585 590
Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
595 600 605
Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
610 615 620
Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630 635

<210> 325

<211> 638

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 325

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

Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
 210 215 220
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
 225 230 235 240
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
 245 250 255
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 260 265 270
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
 275 280 285
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 290 295 300
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 305 310 315 320
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 325 330 335
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 340 345 350
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
 355 360 365
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 370 375 380
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
 385 390 395 400
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 405 410 415
 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 420 425 430
 Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 435 440 445
 Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 450 455 460
 Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 465 470 475 480
 Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
 485 490 495
 Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 500 505 510
 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
 515 520 525

ES 2 567 634 T3

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
530 535 540
Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
545 550 555 560
Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
565 570 575
Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
580 585 590
Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
595 600 605
Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
610 615 620
Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630 635

<210> 326

<211> 640

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 326

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

Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	180	185	190
Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	195	200	205
Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	210	215	220
Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	225	230	235
Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	245	250	255
Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	260	265	270
Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	275	280	285
Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	290	295	300
Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	305	310	315
Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	325	330	335
Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	340	345	350
Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	355	360	365
Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	370	375	380
Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	385	390	395
Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	405	410	415
Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	420	425	430
Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	435	440	445
Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	450	455	460
Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	465	470	475
Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	485	490	495

Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
500 505 510

Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
515 520 525

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
530 535 540

Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
545 550 555 560

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
565 570 575

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
580 585 590

Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
595 600 605

Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
610 615 620

Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630 635 640

<210> 327

<211> 640

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 327

Met Arg Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Leu Trp Ala Pro Ala Arg Gly Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly
20 25 30

Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly
35 40 45

Cys Lys Val Leu Arg Arg His Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
50 55 60

Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile
65 70 75 80

Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys
85 90 95

Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu
100 105 110

Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys
115 120 125

Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp
130 135 140

Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His
 145 150 155 160
 Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp
 165 170 175
 Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys
 180 185 190
 Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
 195 200 205
 Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys
 210 215 220
 Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu
 225 230 235 240
 Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala
 245 250 255
 Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala
 260 265 270
 Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys
 275 280 285
 Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp
 290 295 300
 Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
 305 310 315 320
 Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys
 325 330 335
 Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu
 340 345 350
 Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys
 355 360 365
 Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met
 370 375 380
 Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu
 385 390 395 400
 Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys
 405 410 415
 Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe
 420 425 430
 Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
 435 440 445
 Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val
 450 455 460
 Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu

465 470 475 480
Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
 485 490 495
Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
 500 505 510
Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
 515 520 525
Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 530 535 540
Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
545 550 555 560
Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
 565 570 575
Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
 580 585 590
Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
 595 600 605
Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
 610 615 620
Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630 635 640

<210> 328

<211> 638

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 328

Met Lys Val Ser Val Ala Ala Leu Ser Cys Leu Met Leu Val Thr Ala
1 5 10 15
Leu Gly Ser Gln Ala Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe
 20 25 30
Gly Gly Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys
 35 40 45
Val Leu Arg Arg His Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
 50 55 60
Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe
65 70 75 80
Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val
 85 90 95
Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
 100 105 110
Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys

ES 2 567 634 T3

115	120	125
Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys 130 135 140		
Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp 145 150 155 160		
Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met 165 170 175		
Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu 180 185 190		
Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu 195 200 205		
Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala 210 215 220		
Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp 225 230 235 240		
Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu 245 250 255		
Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu 260 265 270		
Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val 275 280 285		
Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu 290 295 300		
Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn 305 310 315 320		
Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu 325 330 335		
Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro 340 345 350		
Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val 355 360 365		
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu 370 375 380		
Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu 385 390 395 400		
Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala 405 410 415		
Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro 420 425 430		
Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe 435 440 445		

ES 2 567 634 T3

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

<210> 329

<211> 571

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 329

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro Met Val Trp Ala Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe
 20 25 30
 Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys
 35 40 45
 Val Leu Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
 50 55 60
 Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
 65 70 75 80
 Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
 85 90 95

Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala		
			100					105					110				
Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile		
		115					120					125					
Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala		
	130					135					140						
Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys		
145				150					155						160		
Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys		
			165					170						175			
Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe		
			180				185						190				
Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg		
	195						200					205					
Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu		
	210					215					220						
Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala		
225					230					235					240		
Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser		
			245					250						255			
Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys		
			260				265						270				
Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu		
	275						280					285					
Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn		
	290				295						300						
Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr		
305				310						315					320		
Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala		
			325					330						335			
Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro		
		340					345						350				
His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu		
	355						360					365					
Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu		
	370				375						380						
Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys		
385				390						395					400		
Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu		
			405					410						415			

ES 2 567 634 T3

Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
420 425 430
Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val
435 440 445
Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
450 455 460
Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
465 470 475 480
Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
485 490 495
Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
500 505 510
Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu
515 520 525
Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
530 535 540
Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
545 550 555 560
Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
565 570

<210> 330

<211> 638

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 330

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

Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
 130 135 140
 Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
 145 150 155 160
 Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met
 165 170 175
 Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu
 180 185 190
 Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
 195 200 205
 Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
 210 215 220
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
 225 230 235 240
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
 245 250 255
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 260 265 270
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
 275 280 285
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 290 295 300
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 305 310 315 320
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 325 330 335
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 340 345 350
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
 355 360 365
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 370 375 380
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
 385 390 395 400
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 405 410 415
 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 420 425 430
 Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 435 440 445

ES 2 567 634 T3

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

<210> 331

<211> 638

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 331

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro Met Val Trp Ala Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe
 20 25 30
 Gly Arg Gly Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys
 35 40 45
 Val Leu Arg Arg His Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
 50 55 60
 Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe
 65 70 75 80
 Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val
 85 90 95

ES 2 567 634 T3

Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
 100 105 110
 Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
 115 120 125
 Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
 130 135 140
 Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
 145 150 155 160
 Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met
 165 170 175
 Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu
 180 185 190
 Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
 195 200 205
 Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
 210 215 220
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
 225 230 235 240
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
 245 250 255
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 260 265 270
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
 275 280 285
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 290 295 300
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 305 310 315 320
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 325 330 335
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 340 345 350
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
 355 360 365
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 370 375 380
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
 385 390 395 400
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 405 410 415

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

<210> 332

<211> 641

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 332

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60

ES 2 567 634 T3

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu

ES 2 567 634 T3

```

385              390              395              400
Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
              405              410              415
Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
              420              425              430
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
              435              440              445
Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
              450              455              460
Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
              465              470              475              480
Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
              485              490              495
Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
              500              505              510
Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
              515              520              525
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
              530              535              540
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
              545              550              555              560
Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
              565              570              575
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
              580              585              590
Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
              595              600              605
Leu Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met
              610              615              620
Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg
              625              630              635              640

```

His

<210> 333

<211> 642

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 333

```

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
  1              5              10              15

```

```

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser

```

ES 2 567 634 T3

				20				25				30			
Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys	Met	Asp	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu
		35					40					45			
Gly	Cys	Lys	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Gly	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val
		50				55						60			
Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val
		65				70						75			
Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His
				85						90				95	
Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala
			100					105					110		
Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly
		115					120					125			
Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met
		130				135						140			
Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu
		145				150						155			160
Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu
				165						170				175	
Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu
			180					185					190		
Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala
		195					200					205			
Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu
		210				215						220			
Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp
		225				230						235			240
Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys
				245						250				255	
Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala
			260					265					270		
Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val
		275					280							285	
Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His
		290				295						300			
Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr
		305				310						315			320
Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys
				325						330				335	
Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn
			340					345					350		

ES 2 567 634 T3

Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu
 355 360 365
 Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu
 370 375 380
 Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val
 385 390 395 400
 Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys
 405 410 415
 Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp
 420 425 430
 Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn
 435 440 445
 Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu
 450 455 460
 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 465 470 475 480
 Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys
 485 490 495
 His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val
 500 505 510
 Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp
 515 520 525
 Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys
 530 535 540
 Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn
 545 550 555 560
 Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys
 565 570 575
 Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His
 580 585 590
 Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe
 595 600 605
 Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys
 610 615 620
 Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu
 625 630 635 640
 Gly Leu

<210> 334

<211> 639

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 334

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val Ser
 20 25 30
 Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu Glu
 35 40 45
 Lys Met Pro Leu Glu Asp Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
 50 55 60
 Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
 65 70 75 80
 Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
 85 90 95
 Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
 100 105 110
 Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
 115 120 125
 Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
 130 135 140
 Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
 145 150 155 160
 Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
 165 170 175
 Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
 195 200 205
 Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
 210 215 220
 Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
 225 230 235 240
 Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
 245 250 255
 Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 260 265 270
 Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
 275 280 285
 Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 290 295 300

ES 2 567 634 T3

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
 305 310 315 320
 Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
 325 330 335
 Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met
 340 345 350
 Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
 355 360 365
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
 370 375 380
 Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
 385 390 395 400
 Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 405 410 415
 Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
 420 425 430
 Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu
 435 440 445
 Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
 450 455 460
 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
 465 470 475 480
 Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
 485 490 495
 Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
 500 505 510
 Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
 515 520 525
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 530 535 540
 Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
 545 550 555 560
 Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
 565 570 575
 Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 580 585 590
 Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
 595 600 605
 Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
 610 615 620
 Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 625 630 635

<210> 335

<211> 639

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 335

ES 2 567 634 T3

Met	Lys	Trp	Val	Ser	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala			
1				5					10					15				
Tyr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Lys	Arg	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala			
			20					25					30					
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu			
		35				40						45						
Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val			
	50					55					60							
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp			
65					70					75					80			
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp			
				85				90						95				
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala			
			100					105					110					
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln			
		115					120					125						
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val			
	130					135					140							
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys			
145					150					155					160			
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro			
				165					170					175				
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys			
			180					185					190					
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu			
		195					200					205						
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys			
	210					215					220							
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val			
225					230					235					240			
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser			
				245					250					255				
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly			
			260					265					270					

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe
 610 615 620
 Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp
 625 630 635

<210> 336

<211> 646

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 336

```

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1           5           10           15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu
      20           25           30

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

Val Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Ala His
      50           55           60

Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe
      65           70           75           80

Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro
      85           90           95

Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys
      100          105          110

Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His
      115          120          125

Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr
      130          135          140

Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn
      145          150          155          160

Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu
      165          170          175

Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu
      180          185          190

Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro
      195          200          205

Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala
      210          215          220

Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu
      225          230          235          240

```

ES 2 567 634 T3

Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys
245 250 255

Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe
260 265 270

Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu
275 280 285

Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr
290 295 300

Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp
305 310 315 320

Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu
325 330 335

Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala
340 345 350

Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala
355 360 365

Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
370 375 380

Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro
385 390 395 400

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

Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala
420 425 430

Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu
435 440 445

Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
450 455 460

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

Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser
485 490 495

Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
500 505 510

Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
515 520 525

Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn
530 535 540

Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro
545 550 555 560

ES 2 567 634 T3

Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr
565 570 575
Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu
580 585 590
Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val
595 600 605
Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp
610 615 620
Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser
625 630 635 640
Gln Ala Ala Leu Gly Leu
645

<210> 337

<211> 646

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 337

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

ES 2 567 634 T3

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

ES 2 567 634 T3

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560
Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590
Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605
Leu Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser Glu Pro Asn Glu Glu Ala
610 615 620
Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val Pro Pro Trp Thr Gly Glu
625 630 635 640
Val Ser Pro Ala Gln Arg
645

<210> 338

<211> 629

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 338

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

Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val
 145 150 155 160
 Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu
 165 170 175
 Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr
 180 185 190
 Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala
 195 200 205
 Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro
 210 215 220
 Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln
 225 230 235 240
 Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys
 245 250 255
 Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe
 260 265 270
 Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu
 275 280 285
 Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu
 290 295 300
 Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys
 305 310 315 320
 Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu
 325 330 335
 Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp
 340 345 350
 Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp
 355 360 365
 Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp
 370 375 380
 Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr
 385 390 395 400
 Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys
 405 410 415
 Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile
 420 425 430
 Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln
 435 440 445
 Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr
 450 455 460

Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys
 465 470 475 480
 Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr
 485 490 495
 Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro
 500 505 510
 Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg
 515 520 525
 Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys
 530 535 540
 Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu
 545 550 555 560
 Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu
 565 570 575
 Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met
 580 585 590
 Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys
 595 600 605
 Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln
 610 615 620
 Ala Ala Leu Gly Leu
 625

<210> 339

<211> 629

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 339

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

ES 2 567 634 T3

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser Lys Leu Arg Ala Leu
610 615 620

Leu Thr Ala Pro Arg
625

<210> 340

<211> 631

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 340

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly
20 25 30

Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys Asp Ala
35 40 45

His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn
50 55 60

Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys
65 70 75 80

ES 2 567 634 T3

Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala
85 90 95

Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu
100 105 110

His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu
115 120 125

Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg
130 135 140

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

Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn
165 170 175

Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His
180 185 190

Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys
195 200 205

Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu
210 215 220

Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala
225 230 235 240

Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala
245 250 255

Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala
260 265 270

Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His
275 280 285

Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala
290 295 300

Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys
305 310 315 320

Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile
325 330 335

Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala
340 345 350

Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala
355 360 365

Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His
370 375 380

Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu
385 390 395 400

ES 2 567 634 T3

Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr
 405 410 415
 Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn
 420 425 430
 Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys
 435 440 445
 Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
 450 455 460
 Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly
 465 470 475 480
 Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu
 485 490 495
 Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys
 500 505 510
 Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val
 515 520 525
 Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val
 530 535 540
 Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val
 565 570 575
 Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala
 580 585 590
 Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp
 595 600 605
 Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
 610 615 620
 Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 625 630

<210> 341

<211> 631

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 341

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45

ES 2 567 634 T3

Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	50	55	60
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	65	70	75
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	85	90	95
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	100	105	110
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	115	120	125
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	130	135	140
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	145	150	155
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	165	170	175
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	180	185	190
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	195	200	205
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	210	215	220
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	225	230	235
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	245	250	255
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	260	265	270
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	275	280	285
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	290	295	300
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	305	310	315
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	325	330	335
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	340	345	350
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	355	360	365

ES 2 567 634 T3

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
 610 615 620
 Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 625 630

<210> 342

<211> 647

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 342

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

ES 2 567 634 T3

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Glu Val Lys Tyr Asp Pro Cys Phe
 20 25 30
 Gly His Lys Ile Asp Arg Ile Asn His Val Ser Asn Leu Gly Cys Pro
 35 40 45
 Ser Leu Arg Asp Pro Arg Pro Asn Ala Pro Ser Thr Ser Ala Asp Ala
 50 55 60
 His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn
 65 70 75 80
 Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys
 85 90 95
 Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala
 100 105 110
 Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu
 115 120 125
 His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu
 130 135 140
 Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg
 145 150 155 160
 Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg
 165 170 175
 Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn
 180 185 190
 Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His
 195 200 205
 Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys
 210 215 220
 Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu
 225 230 235 240
 Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala
 245 250 255
 Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala
 260 265 270
 Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala
 275 280 285
 Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His
 290 295 300
 Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala
 305 310 315 320
 Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys
 325 330 335

ES 2 567 634 T3

Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile
 340 345 350
 Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala
 355 360 365
 Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala
 370 375 380
 Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His
 385 390 395 400
 Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu
 405 410 415
 Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr
 420 425 430
 Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn
 435 440 445
 Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys
 450 455 460
 Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
 465 470 475 480
 Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly
 485 490 495
 Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu
 500 505 510
 Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys
 515 520 525
 Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val
 530 535 540
 Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val
 545 550 555 560
 Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys
 565 570 575
 Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val
 580 585 590
 Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala
 595 600 605
 Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp
 610 615 620
 Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
 625 630 635 640
 Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 645

<210> 343

<211> 647

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 343

ES 2 567 634 T3

Met	Lys	Trp	Val	Ser	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	1	5	10	15
Tyr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Lys	Arg	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	20	25	30	
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	35	40	45	
Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	50	55	60	
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	65	70	75	80
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	85	90	95	
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	100	105	110	
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	115	120	125	
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	130	135	140	
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	145	150	155	160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	165	170	175	
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	180	185	190	
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	195	200	205	
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	210	215	220	
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	225	230	235	240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	245	250	255	
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	260	265	270	
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	275	280	285	

ES 2 567 634 T3

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Glu Val Lys Tyr Asp Pro Cys Phe Gly His Lys Ile Asp Arg Ile
 610 615 620
 Asn His Val Ser Asn Leu Gly Cys Pro Ser Leu Arg Asp Pro Arg Pro
 625 630 635 640
 Asn Ala Pro Ser Thr Ser Ala
 645

<210> 344
 <211> 642
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 344

```

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1           5           10           15

Tyr Ser Gly Ser Leu Asp Lys Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
 20           25           30

Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu
 35           40           45

Gly Cys Lys Val Leu Arg Gly Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val
 50           55           60

Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val
 65           70           75           80

Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His
 85           90           95

Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala
100           105           110

Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly
115           120           125

Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met
130           135           140

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

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

Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu
180           185           190

Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala
195           200           205

Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu
210           215           220

Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp
225           230           235           240

```

ES 2 567 634 T3

Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys
 245 250 255
 Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala
 260 265 270
 Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val
 275 280 285
 Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His
 290 295 300
 Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr
 305 310 315 320
 Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys
 325 330 335
 Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn
 340 345 350
 Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu
 355 360 365
 Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu
 370 375 380
 Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val
 385 390 395 400
 Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys
 405 410 415
 Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp
 420 425 430
 Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn
 435 440 445
 Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu
 450 455 460
 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 465 470 475 480
 Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys
 485 490 495
 His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val
 500 505 510
 Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp
 515 520 525
 Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys
 530 535 540
 Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn
 545 550 555 560
 Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys

ES 2 567 634 T3

565 570 575
 Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His
 580 585 590
 Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe
 595 600 605
 Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys
 610 615 620
 Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu
 625 630 635 640
 Gly Leu
 <210> 345
 <211> 638
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 345
 Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro Met Val Trp Ala Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe
 20 25 30
 Gly Arg Gly Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys
 35 40 45
 Val Leu Arg Arg His Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
 50 55 60
 Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe
 65 70 75 80
 Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val
 85 90 95
 Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
 100 105 110
 Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
 115 120 125
 Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
 130 135 140
 Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
 145 150 155 160
 Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met
 165 170 175
 Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu
 180 185 190
 Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
 195 200 205

ES 2 567 634 T3

Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
 210 215 220
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
 225 230 235 240
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
 245 250 255
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 260 265 270
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
 275 280 285
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 290 295 300
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 305 310 315 320
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 325 330 335
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 340 345 350
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
 355 360 365
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 370 375 380
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
 385 390 395 400
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 405 410 415
 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 420 425 430
 Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 435 440 445
 Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 450 455 460
 Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 465 470 475 480
 Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
 485 490 495
 Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 500 505 510
 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
 515 520 525

ES 2 567 634 T3

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
530 535 540
Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
545 550 555 560
Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
565 570 575
Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
580 585 590
Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
595 600 605
Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
610 615 620
Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630 635

<210> 346

<211> 641

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 346

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

ES 2 567 634 T3

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 180 185 190
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 195 200 205
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 210 215 220
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 245 250 255
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 260 265 270
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 275 280 285
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 290 295 300
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 305 310 315 320
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 325 330 335
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 340 345 350
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 355 360 365
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 370 375 380
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 385 390 395 400
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 405 410 415
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 420 425 430
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 435 440 445
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 450 455 460
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 465 470 475 480
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 485 490 495

ES 2 567 634 T3

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
500 505 510

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
515 520 525

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
530 535 540

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
545 550 555 560

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
565 570 575

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
580 585 590

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
595 600 605

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
610 615 620

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
625 630 635 640

Leu

<210> 347

<211> 641

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 347

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Leu Asp Lys Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
20 25 30

Gly Cys Phe Gly Arg Gly Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu
35 40 45

Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
50 55 60

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
65 70 75 80

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
85 90 95

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
100 105 110

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
115 120 125

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala

ES 2 567 634 T3

130	135	140
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln 145 150 155 160		
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val 165 170 175		
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys 180 185 190		
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro 195 200 205		
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys 210 215 220		
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu 225 230 235 240		
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys 245 250 255		
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val 260 265 270		
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser 275 280 285		
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly 290 295 300		
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile 305 310 315 320		
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu 325 330 335		
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp 340 345 350		
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser 355 360 365		
Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly 370 375 380		
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val 385 390 395 400		
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys 405 410 415		
Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu 420 425 430		
Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys 435 440 445		
Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu 450 455 460		

ES 2 567 634 T3

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 465 470 475 480
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 485 490 495
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 500 505 510
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 515 520 525
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 530 535 540
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 545 550 555 560
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 565 570 575
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 580 585 590
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 595 600 605
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 610 615 620
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 625 630 635 640

Leu

<210> 348

<211> 641

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 348

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

ES 2 567 634 T3

85										90					95				
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala				
100								105				110							
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln				
115								120				125							
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val				
130				135								140							
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys				
145				150				155				160							
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro				
				165				170				175							
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys				
				180				185				190							
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu				
195								200				205							
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys				
210				215				220											
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val				
225				230				235				240							
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser				
				245				250				255							
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly				
				260				265				270							
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile				
275								280				285							
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu				
290				295				300											
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp				
305				310				315				320							
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser				
				325				330				335							
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly				
				340				345				350							
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val				
355				360				365											
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys				
370				375				380											
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu				
385				390				395				400							
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys				
				405				410				415							

ES 2 567 634 T3

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

His

<210> 349

<211> 909

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 349

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro Met Val Trp Ala Met Ala His Tyr His Asp Asp Tyr Gly Lys Asn
 20 25 30
 Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys
 35 40 45

ES 2 567 634 T3

Val	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	His	Ser	Ile	Lys	Glu	Val	50	55	60
Ala	Thr	Ser	Val	Gln	Leu	Thr	Leu	Arg	Ser	Lys	Lys	Asp	Tyr	Leu	His	65	70	75
Gly	Asp	Asn	Ser	Asp	Ile	Ile	Pro	Thr	Asp	Thr	Ile	Lys	Asn	Thr	Val	85	90	95
His	Val	Leu	Ala	Lys	Phe	Lys	Gly	Ile	Lys	Ser	Ile	Glu	Thr	Phe	Ala	100	105	110
Met	Asn	Ile	Cys	Glu	His	Phe	Leu	Ser	Ser	Phe	Ser	His	Val	Thr	Arg	115	120	125
Ala	His	Val	Tyr	Val	Glu	Glu	Val	Pro	Trp	Lys	Arg	Phe	Glu	Lys	Asn	130	135	140
Gly	Val	Lys	His	Val	His	Ala	Phe	Ile	His	Thr	Pro	Thr	Gly	Thr	His	145	150	155
Phe	Cys	Asp	Val	Glu	Gln	Val	Arg	Asn	Gly	Pro	Pro	Ile	Ile	His	Ser	165	170	175
Gly	Ile	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Thr	Thr	Gln	Ser	Gly	Phe	Glu	180	185	190
Gly	Phe	Ile	Lys	Asp	Gln	Phe	Thr	Thr	Leu	Pro	Glu	Val	Lys	Asp	Arg	195	200	205
Cys	Phe	Ala	Thr	Gln	Val	Tyr	Cys	Lys	Trp	Arg	Tyr	Gln	Asn	Arg	Asp	210	215	220
Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Thr	Trp	Gly	Ala	Val	Arg	Asp	Ile	Val	Leu	Lys	225	230	235
Lys	Phe	Ala	Gly	Pro	Tyr	Asp	Arg	Gly	Glu	Tyr	Ser	Pro	Ser	Val	Gln	245	250	255
Lys	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ile	Gln	Val	Leu	Thr	Leu	Ser	Gln	Leu	Pro	Glu	260	265	270
Ile	Glu	Asp	Met	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro	Asn	Ile	His	Tyr	Phe	Asn	Ile	275	280	285
Asp	Met	Ser	Lys	Met	Gly	Leu	Ile	Asn	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Leu	Pro	290	295	300
Leu	Asp	Asn	Pro	Tyr	Gly	Lys	Ile	Thr	Gly	Thr	Val	Arg	Arg	Lys	Leu	305	310	315
Pro	Ser	Arg	Leu	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	325	330	335
Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	340	345	350
Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	355	360	365

ES 2 567 634 T3

Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
 370 375 380
 Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr
 385 390 395 400
 Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala
 405 410 415
 Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp
 420 425 430
 Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
 435 440 445
 Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr
 450 455 460
 Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe
 465 470 475 480
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala
 485 490 495
 Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu
 500 505 510
 Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
 515 520 525
 Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
 530 535 540
 Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
 545 550 555 560
 Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 565 570 575
 Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 580 585 590
 Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 595 600 605
 Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 610 615 620
 Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
 625 630 635 640
 Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 645 650 655
 Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 660 665 670
 Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 675 680 685
 Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu

ES 2 567 634 T3

690	695	700
Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu		
705	710	715
Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr		
	725	730
Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg		
	740	745
Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys		
	755	760
Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu		
	770	775
Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys		
	785	790
Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu		
	805	810
Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr		
	820	825
Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys		
	835	840
Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr		
	850	855
Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu		
	865	870
Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly		
	885	890
Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
	900	905

<210> 350

<211> 912

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 350

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

ES 2 567 634 T3

65	70	75	80
Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp	85	90	95
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala	100	105	110
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln	115	120	125
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val	130	135	140
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys	145	150	155
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro	165	170	175
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys	180	185	190
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu	195	200	205
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys	210	215	220
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val	225	230	235
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser	245	250	255
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly	260	265	270
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile	275	280	285
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu	290	295	300
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp	305	310	315
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser	325	330	335
Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly	340	345	350
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val	355	360	365
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys	370	375	380
Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu	385	390	395
			400

ES 2 567 634 T3

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Met Ala His Tyr His Asp Asp Tyr Gly Lys Asn Asp Glu Val Glu
 610 615 620
 Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys Val Leu His Ile
 625 630 635 640
 Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val
 645 650 655
 Gln Leu Thr Leu Arg Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser
 660 665 670
 Asp Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala
 675 680 685
 Lys Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Thr Phe Ala Met Asn Ile Cys
 690 695 700
 Glu His Phe Leu Ser Ser Phe Ser His Val Thr Arg Ala His Val Tyr
 705 710 715 720

ES 2 567 634 T3

Val Glu Glu Val Pro Trp Lys Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His
725 730 735

Val His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Asp Val
740 745 750

Glu Gln Val Arg Asn Gly Pro Pro Ile Ile His Ser Gly Ile Lys Asp
755 760 765

Leu Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys
770 775 780

Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr
785 790 795 800

Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr Gln Asn Arg Asp Val Asp Phe Glu
805 810 815

Ala Thr Trp Gly Ala Val Arg Asp Ile Val Leu Lys Lys Phe Ala Gly
820 825 830

Pro Tyr Asp Arg Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr
835 840 845

Asp Ile Gln Val Leu Thr Leu Ser Gln Leu Pro Glu Ile Glu Asp Met
850 855 860

Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys
865 870 875 880

Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro
885 890 895

Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Arg Arg Lys Leu Pro Ser Arg Leu
900 905 910

<210> 351

<211> 1019

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 351

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe
20 25 30

Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu
35 40 45

Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu
50 55 60

Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys
65 70 75 80

Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val

ES 2 567 634 T3

85										90					95															
Val	Glu	Leu	Ile	Asp	Leu	Val	Ala	Glu	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ala	Ser	Gln															
			100					105					110																	
Glu	Ala	Lys	Asp	Lys	Leu	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Glu	Asp	Ser	Glu	Pro															
		115					120					125																		
Val	Leu	Ser	Glu	Glu	His	Lys	Val	Val	Val	Arg	Asn	Phe	Leu	Lys	Ala															
	130					135					140																			
Lys	Lys	Thr	Ser	Arg	Lys	Leu	Val	Glu	Ile	Met	Met	Ala	Gly	Ile	Thr															
145					150					155					160															
Lys	Tyr	Asp	Leu	Gly	Ile	Glu	Ala	Asp	His	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Pro															
			165					170						175																
Met	Pro	Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Asp	Pro	Phe	Ala	Ser	Val	Gly	Asn															
			180					185					190																	
Gly	Val	Thr	Ile	His	Tyr	Met	Arg	Tyr	Lys	Val	Arg	Gln	Arg	Glu	Thr															
	195					200						205																		
Leu	Phe	Ser	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Asn	His	Pro	Lys	Leu	Ile	Asn	Thr															
	210					215					220																			
Pro	Trp	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp															
225					230					235					240															
Val	Phe	Ile	Tyr	Asn	Asn	Asp	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Arg															
			245					250						255																
Thr	Asp	Leu	Gln	Thr	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	Lys	Asn	Ile	Val	Ala	Asn															
		260					265						270																	
Lys	Glu	Cys	Glu	Phe	Lys	Arg	Ile	Val	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Trp															
	275					280						285																		
Thr	Asn	Leu	Met	His	Leu	Asp	Thr	Trp	Leu	Thr	Met	Leu	Asp	Lys	Asp															
	290					295					300																			
Lys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ile	Ala	Asn	Asp	Val	Phe	Lys	Phe	Trp	Asp															
305					310					315					320															
Tyr	Asp	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Ala	Glu	Pro	Gln	Pro	Val	Glu	Asn	Gly															
			325					330						335																
Leu	Pro	Leu	Glu	Gly	Leu	Leu	Gln	Ser	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Pro	Val															
		340					345						350																	
Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Gly	Glu	Gly	Ala	Ser	Gln	Met	Glu	Ile	Glu	Arg															
	355					360						365																		
Glu	Thr	His	Phe	Asp	Gly	Thr	Asn	Tyr	Leu	Ala	Ile	Arg	Pro	Gly	Val															
	370					375					380																			
Val	Ile	Gly	Tyr	Ser	Arg	Asn	Glu	Lys	Thr	Asn	Ala	Ala	Leu	Glu	Ala															
385					390					395					400															
Ala	Gly	Ile	Lys	Val	Leu	Pro	Phe	His	Gly	Asn	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly															
			405					410						415																

ES 2 567 634 T3

Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val
420 425 430

Lys Trp Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
435 440 445

Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
450 455 460

Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val
465 470 475 480

Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
485 490 495

Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
500 505 510

Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
515 520 525

Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
530 535 540

Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
545 550 555 560

Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
565 570 575

Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
580 585 590

Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
595 600 605

Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys
610 615 620

Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe
625 630 635 640

Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
645 650 655

Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu
660 665 670

Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala
675 680 685

Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser
690 695 700

Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys
705 710 715 720

Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu
725 730 735

ES 2 567 634 T3

Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn
 740 745 750
 Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr
 755 760 765
 Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala
 770 775 780
 Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro
 785 790 795 800
 His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu
 805 810 815
 Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu
 820 825 830
 Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
 835 840 845
 Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu
 850 855 860
 Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
 865 870 875 880
 Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val
 885 890 895
 Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
 900 905 910
 Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
 915 920 925
 Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
 930 935 940
 Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
 945 950 955 960
 Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu
 965 970 975
 Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
 980 985 990
 Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
 995 1000 1005
 Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 1010 1015

<210> 352

<211> 1016

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 352

ES 2 567 634 T3

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro Met Val Trp Ala Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile
 20 25 30
 His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu
 35 40 45
 Pro Gly Arg Glu Ile Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu
 50 55 60
 Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys
 65 70 75 80
 Gln Phe Val Ala Glu Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu
 85 90 95
 Ile Asp Leu Val Ala Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys
 100 105 110
 Asp Lys Leu Ile Glu Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser
 115 120 125
 Glu Glu His Lys Val Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr
 130 135 140
 Ser Arg Lys Leu Val Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp
 145 150 155 160
 Leu Gly Ile Glu Ala Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn
 165 170 175
 Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr
 180 185 190
 Ile His Tyr Met Arg Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser
 195 200 205
 Arg Phe Val Phe Ser Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr
 210 215 220
 Tyr Asp Pro Ser Leu Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile
 225 230 235 240
 Tyr Asn Asn Asp Thr Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu
 245 250 255
 Gln Thr Val Thr Leu Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys
 260 265 270
 Glu Phe Lys Arg Ile Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu
 275 280 285
 Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu
 290 295 300
 Tyr Ser Pro Ile Ala Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu
 305 310 315 320

ES 2 567 634 T3

Val Asn Gly Gly Ala Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu
325 330 335

Glu Gly Leu Leu Gln Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro
340 345 350

Ile Ala Gly Glu Gly Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His
355 360 365

Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly
370 375 380

Tyr Ser Arg Asn Glu Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile
385 390 395 400

Lys Val Leu Pro Phe His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn
405 410 415

Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp Asp
420 425 430

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
435 440 445

Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
450 455 460

Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
465 470 475 480

Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
485 490 495

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
500 505 510

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
515 520 525

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
530 535 540

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
545 550 555 560

Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
565 570 575

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
580 585 590

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
595 600 605

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
610 615 620

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg
625 630 635 640

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys

ES 2 567 634 T3

645										650					655						
Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val						
			660					665					670								
His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg						
		675					680					685									
Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser						
		690				695					700										
Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys						
		705			710					715					720						
Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu						
				725					730					735							
Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu						
			740					745					750								
Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg						
		755					760					765									
His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr						
		770				775					780										
Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys						
					790					795					800						
Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln						
				805					810					815							
Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr						
			820					825					830								
Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln						
		835					840					845									
Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val						
						855					860										
Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala						
					870					875					880						
Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu						
				885					890					895							
Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu						
			900					905					910								
Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr						
		915	</																		

<210> 353
<211> 1019

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 353

```

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1          5          10          15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
      20          25          30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
      35          40          45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
      50          55          60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
      65          70          75          80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
      85          90          95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
      100          105          110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
      115          120          125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
      130          135          140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
      145          150          155          160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
      165          170          175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
      180          185          190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
      195          200          205

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

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val

```

ES 2 567 634 T3

225		230		235		240
Ala Arg Leu Ser	Gln Arg Phe Pro Lys	Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser				
	245	250	255			
Lys Leu Val Thr	Asp Leu Thr Lys	Val His Thr Glu Cys Cys His Gly				
	260	265	270			
Asp Leu Leu Glu Cys Ala	Asp Asp Arg Ala Asp	Leu Ala Lys Tyr Ile				
	275	280	285			
Cys Glu Asn Gln Asp Ser	Ile Ser Ser Lys	Leu Lys Glu Cys Cys Glu				
	290	295	300			
Lys Pro Leu Leu Glu Lys	Ser His Cys Ile	Ala Glu Val Glu Asn Asp				
	310	315	320			
Glu Met Pro Ala Asp	Leu Pro Ser Leu	Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser				
	325	330	335			
Lys Asp Val Cys Lys	Asn Tyr Ala Glu	Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly				
	340	345	350			
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr	Ala Arg Arg His	Pro Asp Tyr Ser Val Val				
	355	360	365			
Leu Leu Leu Arg Leu Ala	Lys Thr Tyr Glu Thr	Thr Leu Glu Lys Cys				
	370	375	380			
Cys Ala Ala Ala Asp	Pro His Glu Cys Tyr	Ala Lys Val Phe Asp Glu				
	385	390	395	400		
Phe Lys Pro Leu Val	Glu Glu Pro Gln	Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys				
	405	410	415			
Glu Leu Phe Glu Gln Leu	Gly Glu Tyr Lys	Phe Gln Asn Ala Leu Leu				
	420	425	430			
Val Arg Tyr Thr Lys Lys	Val Pro Gln Val Ser	Thr Pro Thr Leu Val				
	435	440	445			
Glu Val Ser Arg Asn Leu	Gly Lys Val Gly Ser	Lys Cys Cys Lys His				
	450	455	460			
Pro Glu Ala Lys Arg Met	Pro Cys Ala Glu	Asp Tyr Leu Ser Val Val				
	465	470	475	480		
Leu Asn Gln Leu Cys Val	Leu His Glu Lys	Thr Pro Val Ser Asp Arg				
	485	490	495			
Val Thr Lys Cys Cys Thr	Glu Ser Leu Val	Asn Arg Arg Pro Cys Phe				
	500	505	510			
Ser Ala Leu Glu Val Asp	Glu Thr Tyr Val	Pro Lys Glu Phe Asn Ala				
	515	520	525			
Glu Thr Phe Thr Phe His	Ala Asp Ile Cys Thr	Leu Ser Glu Lys Glu				
	530	535	540			
Arg Gln Ile Lys Lys Gln	Thr Ala Leu Val	Glu Leu Val Lys His Lys				
	545	550	555	560		

ES 2 567 634 T3

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser
 610 615 620
 Glu Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu
 625 630 635 640
 Ile Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala
 645 650 655
 Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala
 660 665 670
 Glu Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val
 675 680 685
 Ala Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile
 690 695 700
 Glu Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys
 705 710 715 720
 Val Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr Ser Arg Lys Leu
 725 730 735
 Val Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu
 740 745 750
 Ala Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr
 755 760 765
 Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met
 770 775 780
 Arg Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe
 785 790 795 800
 Ser Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser
 805 810 815
 Leu Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp
 820 825 830
 Thr Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr
 835 840 845
 Leu Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg
 850 855 860
 Ile Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp
 865 870 875 880

ES 2 567 634 T3

Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile
885 890 895
Ala Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly
900 905 910
Ala Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu
915 920 925
Gln Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu
930 935 940
Gly Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr
945 950 955 960
Asn Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn
965 970 975
Glu Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro
980 985 990
Phe His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met
995 1000 1005
Ser Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
1010 1015

<210> 354
<211> 1019
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 354
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30
His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45
Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60
Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80
Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460

ES 2 567 634 T3

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser
 610 615 620
 Glu Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu
 625 630 635 640
 Ile Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala
 645 650 655
 Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala
 660 665 670
 Glu Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val
 675 680 685
 Ala Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile
 690 695 700
 Glu Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys
 705 710 715 720
 Val Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr Ser Arg Lys Leu
 725 730 735
 Val Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu
 740 745 750
 Ala Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr
 755 760 765
 Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met
 770 775 780
 Arg Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe

ES 2 567 634 T3

```

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

```

<210> 355

<211> 657

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 355

```

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
  1              5              10              15
Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Glu Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro
              20              25              30
Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp
              35              40              45

```

ES 2 567 634 T3

Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys
 50 55 60
 Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 65 70 75 80
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 85 90 95
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 100 105 110
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 115 120 125
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 130 135 140
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 145 150 155 160
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 165 170 175
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 180 185 190
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 195 200 205
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 210 215 220
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 225 230 235 240
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 245 250 255
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 260 265 270
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 275 280 285
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 290 295 300
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 305 310 315 320
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 325 330 335
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 340 345 350
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 355 360 365
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser

ES 2 567 634 T3

370				375				380							
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly
385					390					395					400
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val
				405					410					415	
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
			420					425					430		
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu
			435				440					445			
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys
	450					455					460				
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu
465					470					475					480
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val
				485					490					495	
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His
			500					505					510		
Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val
		515					520					525			
Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg
	530					535					540				
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe
545					550					555					560
Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala
				565					570					575	
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu
			580					585					590		
Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys
		595					600					605			
Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala
	610					615				620					
Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe
625					630					635					640
Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly
				645					650					655	

Leu

<210> 356

<211> 1106

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 356

ES 2 567 634 T3

Met	Lys	Trp	Val	Ser	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	1	5	10	15
Tyr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Lys	Arg	Ala	Arg	Pro	Cys	Ile	Pro	Lys	Ser	20	25	30	
Phe	Gly	Tyr	Ser	Ser	Val	Val	Cys	Val	Cys	Asn	Ala	Thr	Tyr	Cys	Asp	35	40	45	
Ser	Phe	Asp	Pro	Pro	Thr	Phe	Pro	Ala	Leu	Gly	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr	50	55	60	
Glu	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Arg	Arg	Met	Glu	Leu	Ser	Met	Gly	Pro	Ile	65	70	75	80
Gln	Ala	Asn	His	Thr	Gly	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Glu	85	90	95	
Gln	Lys	Phe	Gln	Lys	Val	Lys	Gly	Phe	Gly	Gly	Ala	Met	Thr	Asp	Ala	100	105	110	
Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Pro	Ala	Gln	Asn	Leu	Leu	115	120	125	
Leu	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ser	Glu	Glu	Gly	Ile	Gly	Tyr	Asn	Ile	Ile	Arg	130	135	140	
Val	Pro	Met	Ala	Ser	Cys	Asp	Phe	Ser	Ile	Arg	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Ala	145	150	155	160
Asp	Thr	Pro	Asp	Asp	Phe	Gln	Leu	His	Asn	Phe	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	165	170	175	
Asp	Thr	Lys	Leu	Lys	Ile	Pro	Leu	Ile	His	Arg	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	180	185	190	
Gln	Arg	Pro	Val	Ser	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Trp	195	200	205	
Leu	Lys	Thr	Asn	Gly	Ala	Val	Asn	Gly	Lys	Gly	Ser	Leu	Lys	Gly	Gln	210	215	220	
Pro	Gly	Asp	Ile	Tyr	His	Gln	Thr	Trp	Ala	Arg	Tyr	Phe	Val	Lys	Phe	225	230	235	240
Leu	Asp	Ala	Tyr	Ala	Glu	His	Lys	Leu	Gln	Phe	Trp	Ala	Val	Thr	Ala	245	250	255	
Glu	Asn	Glu	Pro	Ser	Ala	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe	Gln	Cys	260	265	270	
Leu	Gly	Phe	Thr	Pro	Glu	His	Gln	Arg	Asp	Phe	Ile	Ala	Arg	Asp	Leu	275	280	285	
Gly	Pro	Thr	Leu	Ala	Asn	Ser	Thr	His	His	Asn	Val	Arg	Leu	Leu	Met	290	295	300	
Leu	Asp	Asp	Gln	Arg	Leu	Leu	Leu	Pro	His	Trp	Ala	Lys	Val	Val	Leu	305	310	315	320

ES 2 567 634 T3

Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp
 325 330 335
 Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His
 340 345 350
 Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly
 355 360 365
 Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly
 370 375 380
 Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val
 385 390 395 400
 Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn
 405 410 415
 Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys
 420 425 430
 Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser
 435 440 445
 Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln
 450 455 460
 Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala
 465 470 475 480
 Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile
 485 490 495
 Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser
 500 505 510
 Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg Gln Asp Ala His Lys Ser Glu Val
 515 520 525
 Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val
 530 535 540
 Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His
 545 550 555 560
 Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala
 565 570 575
 Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly
 580 585 590
 Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met
 595 600 605
 Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu
 610 615 620
 Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu
 625 630 635 640
 Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu

ES 2 567 634 T3

645								650				655			
Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala
			660					665					670		
Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu
		675					680					685			
Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp
	690					695					700				
Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys
705					710					715					720
Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala
				725					730					735	
Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val
			740					745					750		
Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His
		755					760					765			
Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr
	770					775					780				
Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys
785					790					795					800
Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn
			805					810						815	
Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu
			820					825					830		
Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu
		835					840					845			
Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val
	850					855					860				
Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys
865					870					875					880
Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp
			885					890						895	
Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn
			900					905					910		
Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu
		915					920					925			
Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu
	930					935					940				
Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys
945					950					955					960
His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val
				965				970						975	

Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp
 980 985 990

Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys
 995 1000 1005

Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn
 1010 1015 1020

Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys
 1025 1030 1035 1040

Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His
 1045 1050 1055

Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe
 1060 1065 1070

Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys
 1075 1080 1085

Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu
 1090 1095 1100

Gly Leu
 1105

<210> 357
 <211> 1103
 <212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 357
 Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Pro Met Val Trp Ala Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr
 20 25 30

Ser Ser Val Val Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp
 35 40 45

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

Arg Ser Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn
 65 70 75 80

His Thr Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe
 85 90 95

Gln Lys Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu
 100 105 110

Asn Ile Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser
 115 120 125

Tyr Phe Ser Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met

ES 2 567 634 T3

130		135		140
Ala Ser Cys Asp Phe Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro				
145		150		155
Asp Asp Phe Gln Leu His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys				
	165		170	175
Leu Lys Ile Pro Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro				
	180		185	190
Val Ser Leu Leu Ala Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr				
	195		200	205
Asn Gly Ala Val Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp				
	210		215	220
Ile Tyr His Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala				
225		230		235
Tyr Ala Glu His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu				
	245		250	255
Pro Ser Ala Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe				
	260		265	270
Thr Pro Glu His Gln Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr				
	275		280	285
Leu Ala Asn Ser Thr His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp				
	290		295	300
Gln Arg Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro				
305		310		315
Glu Ala Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp				
	325		330	335
Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe				
	340		345	350
Pro Asn Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe				
	355		360	365
Trp Glu Gln Ser Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr				
	370		375	380
Ser His Ser Ile Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr				
385		390		395
Asp Trp Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg				
	405		410	415
Asn Phe Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe				
	420		425	430
Tyr Lys Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile				
	435		440	445
Pro Glu Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp				
	450		455	460

ES 2 567 634 T3

Leu Asp Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val
 465 470 475 480
 Val Leu Asn Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro
 485 490 495
 Ala Val Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr
 500 505 510
 Tyr Leu Trp Arg Arg Gln Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
 515 520 525
 Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
 530 535 540
 Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
 545 550 555 560
 Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
 565 570 575
 Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
 580 585 590
 Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
 595 600 605
 Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
 610 615 620
 Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
 625 630 635 640
 Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
 645 650 655
 Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
 660 665 670
 Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
 675 680 685
 Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
 690 695 700
 Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
 705 710 715 720
 Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 725 730 735
 Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
 740 745 750
 Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 755 760 765
 Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
 770 775 780

Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
 785 790 795 800
 Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met
 805 810 815
 Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
 820 825 830
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
 835 840 845
 Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
 850 855 860
 Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 865 870 875 880
 Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
 885 890 895
 Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu
 900 905 910
 Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
 915 920 925
 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
 930 935 940
 Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
 945 950 955 960
 Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
 965 970 975
 Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
 980 985 990
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 995 1000 1005
 Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
 1010 1015 1020
 Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
 1025 1030 1035 1040
 Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 1045 1050 1055
 Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
 1060 1065 1070
 Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
 1075 1080 1085
 Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 1090 1095 1100

<210> 358
 <211> 1106
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 358

ES 2 567 634 T3

Met	Lys	Trp	Val	Ser	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	1	5	10	15
Tyr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Lys	Arg	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	20	25	30	
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	35	40	45	
Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	50	55	60	
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	65	70	75	80
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	85	90	95	
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	100	105	110	
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	115	120	125	
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	130	135	140	
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	145	150	155	160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	165	170	175	
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	180	185	190	
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	195	200	205	
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	210	215	220	
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	225	230	235	240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	245	250	255	
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	260	265	270	
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	275	280	285	

ES 2 567 634 T3

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val

ES 2 567 634 T3

610					615					620					
Cys	Val	Cys	Asn	Ala	Thr	Tyr	Cys	Asp	Ser	Phe	Asp	Pro	Pro	Thr	Phe
625					630					635					640
Pro	Ala	Leu	Gly	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr	Glu	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Arg
				645					650					655	
Arg	Met	Glu	Leu	Ser	Met	Gly	Pro	Ile	Gln	Ala	Asn	His	Thr	Gly	Thr
			660					665					670		
Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Lys	Phe	Gln	Lys	Val	Lys
			675				680					685			
Gly	Phe	Gly	Gly	Ala	Met	Thr	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Ala
	690					695					700				
Leu	Ser	Pro	Pro	Ala	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ser	Glu
705					710					715					720
Glu	Gly	Ile	Gly	Tyr	Asn	Ile	Ile	Arg	Val	Pro	Met	Ala	Ser	Cys	Asp
				725					730					735	
Phe	Ser	Ile	Arg	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Pro	Asp	Asp	Phe	Gln
			740					745					750		
Leu	His	Asn	Phe	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Asp	Thr	Lys	Leu	Lys	Ile	Pro
		755					760					765			
Leu	Ile	His	Arg	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gln	Arg	Pro	Val	Ser	Leu	Leu
	770					775					780				
Ala	Ser	Pro	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Trp	Leu	Lys	Thr	Asn	Gly	Ala	Val
785					790					795					800
Asn	Gly	Lys	Gly	Ser	Leu	Lys	Gly	Gln	Pro	Gly	Asp	Ile	Tyr	His	Gln
				805					810					815	
Thr	Trp	Ala	Arg	Tyr	Phe	Val	Lys	Phe	Leu	Asp	Ala	Tyr	Ala	Glu	His
			820					825					830		
Lys	Leu	Gln	Phe	Trp	Ala	Val	Thr	Ala	Glu	Asn	Glu	Pro	Ser	Ala	Gly
		835					840					845			
Leu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe	Gln	Cys	Leu	Gly	Phe	Thr	Pro	Glu	His
	850					855					860				
Gln	Arg	Asp	Phe	Ile	Ala	Arg	Asp	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Ala	Asn	Ser
865					870					875					880
Thr	His	His	Asn	Val	Arg	Leu	Leu	Met	Leu	Asp	Asp	Gln	Arg	Leu	Leu
				885					890					895	
Leu	Pro	His	Trp	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Thr	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys
			900					905					910		
Tyr	Val	His	Gly	Ile	Ala	Val	His	Trp	Tyr	Leu	Asp	Phe	Leu	Ala	Pro
		915					920					925			
Ala	Lys	Ala	Thr	Leu	Gly	Glu	Thr	His	Arg	Leu	Phe	Pro	Asn	Thr	Met
	930					935					940				

ES 2 567 634 T3

Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser
 945 950 955 960
 Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile
 965 970 975
 Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu
 980 985 990
 Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp
 995 1000 1005
 Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro
 1010 1015 1020
 Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser
 1025 1030 1035 1040
 Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val
 1045 1050 1055
 Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg
 1060 1065 1070
 Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe
 1075 1080 1085
 Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg
 1090 1095 1100

Arg Gln
1105

<210> 359
 <211> 1106
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 359
 Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala

ES 2 567 634 T3

100					105					110					
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln
	115						120					125			
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val
	130					135					140				
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys
	145				150					155					160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro
				165					170					175	
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys
			180					185					190		
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu
		195					200					205			
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys
	210					215					220				
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val
	225				230					235					240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser
				245					250					255	
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly
			260					265					270		
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile
	275						280					285			
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu
	290					295					300				
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp
	305				310					315				320	
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly
			340					345					350		
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val
	355						360					365			
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
	370					375					380				
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu
	385				390					395				400	
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys
				405					410					415	
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu
			420					425					430		

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val
 610 615 620
 Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe
 625 630 635 640
 Pro Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg
 645 650 655
 Arg Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr
 660 665 670
 Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys
 675 680 685
 Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala
 690 695 700
 Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu
 705 710 715 720
 Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp
 725 730 735
 Phe Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln
 740 745 750

ES 2 567 634 T3

Leu His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro
 755 760 765
 Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu
 770 775 780
 Ala Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val
 785 790 795 800
 Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln
 805 810 815
 Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His
 820 825 830
 Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly
 835 840 845
 Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His
 850 855 860
 Gln Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser
 865 870 875 880
 Thr His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu
 885 890 895
 Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys
 900 905 910
 Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro
 915 920 925
 Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met
 930 935 940
 Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser
 945 950 955 960
 Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile
 965 970 975
 Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu
 980 985 990
 Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp
 995 1000 1005
 Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro
 1010 1015 1020
 Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser
 1025 1030 1035 1040
 Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val
 1045 1050 1055
 Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg
 1060 1065 1070
 Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe
 1075 1080 1085
 Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg
 1090 1095 1100
 Arg Gln
 1105
 <210> 360
 <211> 661
 <212> PRT

ES 2 567 634 T3

<213> Homo sapiens

<400> 360

```

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1           5           10           15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe
 20           25           30

Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln
 35           40           45

Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn
 50           55           60

Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr Asp Ala His Lys
 65           70           75           80

Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys
 85           90           95

Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe
100           105           110

Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr
115           120           125

Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr
130           135           140

Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr
145           150           155           160

Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu
165           170           175

Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val
180           185           190

Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu
195           200           205

Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr
210           215           220

Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala
225           230           235           240

```


ES 2 567 634 T3

Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro
 245 250 255
 Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln
 260 265 270
 Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys
 275 280 285
 Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe
 290 295 300
 Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu
 305 310 315 320
 Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu
 325 330 335
 Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys
 340 345 350
 Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu
 355 360 365
 Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp
 370 375 380
 Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp
 385 390 395 400
 Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp
 405 410 415
 Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr
 420 425 430
 Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys
 435 440 445
 Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile
 450 455 460
 Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln
 465 470 475 480
 Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr
 485 490 495
 Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys
 500 505 510
 Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr
 515 520 525
 Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro
 530 535 540
 Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg
 545 550 555 560
 Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys

ES 2 567 634 T3

565										570					575				
Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu				
			580					585					590						
Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu				
		595					600					605							
Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met				
	610					615					620								
Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys				
625					630					635					640				
Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln				
				645					650					655					
Ala	Ala	Leu	Gly	Leu															
			660																

<210> 361
<211> 658
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 361
Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
  1          5          10          15

Pro Met Val Trp Ala Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu
  20          25          30

Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala
  35          40          45

His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro
  50          55          60

Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr Asp Ala His Lys Ser Glu Val
  65          70          75          80

Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val
  85          90          95

Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His
  100          105          110

Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala
  115          120          125

Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly
  130          135          140

Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met
  145          150          155          160

Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu
  165          170          175

```

ES 2 567 634 T3

Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu
 180 185 190
 Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu
 195 200 205
 Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala
 210 215 220
 Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu
 225 230 235 240
 Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp
 245 250 255
 Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys
 260 265 270
 Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala
 275 280 285
 Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val
 290 295 300
 Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His
 305 310 315 320
 Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr
 325 330 335
 Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys
 340 345 350
 Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn
 355 360 365
 Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu
 370 375 380
 Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu
 385 390 395 400
 Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val
 405 410 415
 Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys
 420 425 430
 Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp
 435 440 445
 Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn
 450 455 460
 Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu
 465 470 475 480
 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 485 490 495
 Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys

ES 2 567 634 T3

500							505					510				
His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	
515							520					525				
Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	
530							535					540				
Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	
545							550					555				
Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	
565							570					575				
Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	
580							585					590				
Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	
595							600					605				
Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	
610							615					620				
Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	
625							630					635				
Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	
645							650					655				

Gly Leu

<210> 362

<211> 661

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 362

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

ES 2 567 634 T3

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

ES 2 567 634 T3

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

<210> 363

<211> 661

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 363

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60

ES 2 567 634 T3

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly
 610 615 620
 Cys Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr
 625 630 635 640
 Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile
 645 650 655
 Ser Pro Gln Gly Tyr
 660

<210> 364

<211> 735

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 364

ES 2 567 634 T3

Met	Lys	Trp	Val	Ser	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	1	5	10	15
Tyr	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	20	25	30	
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	35	40	45	
Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	50	55	60	
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	65	70	75	80
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	85	90	95	
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	100	105	110	
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	115	120	125	
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	130	135	140	
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	145	150	155	160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	165	170	175	
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	180	185	190	
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	195	200	205	
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	210	215	220	
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	225	230	235	240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	245	250	255	
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	260	265	270	
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	275	280	285	
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	290	295	300	
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	305	310	315	320

ES 2 567 634 T3

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Glu Pro Leu Glu Lys Val Ala Ser Val Gly Asn Ser Arg Pro Thr
 610 615 620
 Gly Gln Gln Leu Glu Ser Leu Gly Leu Leu Ala Pro Gly Glu Gln Ser
 625 630 635 640
 Leu Pro Cys Thr Glu Arg Lys Pro Ala Ala Thr Ala Arg Leu Ser Arg

ES 2 567 634 T3

				645						650						655			
Arg	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	Pro	Pro	Pro	Glu	Ser	Ser	Gly	Ser	Pro	Gln				
			660					665					670						
Gln	Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	Pro	His	Ser	Arg	Gln	Ile	Pro	Ala	Pro	Gln				
		675					680					685							
Gly	Ala	Val	Leu	Val	Gln	Arg	Glu	Lys	Asp	Leu	Pro	Asn	Tyr	Asn	Trp				
		690				695					700								
Asn	Ser	Phe	Gly	Leu	Arg	Phe	Gly	Lys	Arg	Glu	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn				
705					710					715					720				
His	Gly	Arg	Ser	Ala	Gly	Arg	Gly	Trp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gln					
				725					730					735					

<210> 365

<211> 735

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 365

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

ES 2 567 634 T3

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala

ES 2 567 634 T3

515	520	525
Glu Thr Phe Thr Phe His	Ala Asp Ile Cys Thr	Leu Ser Glu Lys Glu
530	535	540
Arg Gln Ile Lys Lys Gln	Thr Ala Leu Val	Glu Leu Val Lys His Lys
545	550	555
Pro Lys Ala Thr	Lys Glu Gln Leu Lys	Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
	565	570
Ala Phe Val Glu	Lys Cys Cys Lys	Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
	580	585
Ala Glu Glu Gly Lys Lys	Leu Val Ala Ala	Ser Gln Ala Ala Leu Gly
	595	600
Leu Glu Pro Leu Glu Lys	Val Ala Ser Val	Gly Asn Ser Arg Pro Thr
	610	615
Gly Gln Gln Leu Glu Ser	Leu Gly Leu Leu	Ala Pro Gly Glu Gln Ser
	625	630
Leu Pro Cys Thr Glu Arg	Lys Pro Ala Ala	Thr Ala Arg Leu Ser Arg
	645	650
Arg Gly Thr Ser Leu Ser	Pro Pro Pro Glu Ser	Ser Gly Ser Pro Gln
	660	665
Gln Pro Gly Leu Ser Ala	Pro His Ser Arg	Gln Ile Pro Ala Pro Gln
	675	680
Gly Ala Val Leu Val Gln	Arg Glu Lys Asp	Leu Pro Asn Tyr Asn Trp
	695	700
Asn Ser Phe Gly Leu Arg	Phe Gly Lys Arg	Glu Ala Ala Pro Gly Asn
	705	710
His Gly Arg Ser Ala Gly	Arg Gly Trp Gly	Ala Gly Ala Gly Gln
	725	730

<210> 366

<211> 809

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 366

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Lys Asn Leu Glu Pro Val Ser Trp
20 25 30
Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gly Lys Gly Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu Asp Ile Ile Cys Pro Arg Ala Glu Ala
50 55 60

Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr Lys Leu Tyr Leu Val Arg Pro Glu Gln
 65 70 75 80
 Ala Ala Ala Cys Ser Thr Val Leu Asp Pro Asn Val Leu Val Thr Cys
 85 90 95
 Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile Lys Phe Gln Glu Phe
 100 105 110
 Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys His His Asp Tyr Tyr
 115 120 125
 Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly Leu Glu Asn Arg Glu
 130 135 140
 Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile Ile Met Lys Val Gly
 145 150 155 160
 Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu Thr Thr Ser Arg Pro
 165 170 175
 Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala Thr Gln Ala Pro Gly
 180 185 190
 Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys His Glu Thr Val Asn
 195 200 205
 Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gly Ser Ser Gly Asp
 210 215 220
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 225 230 235 240
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 245 250 255
 Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 260 265 270
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 275 280 285
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 290 295 300
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 305 310 315 320
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 325 330 335
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 340 345 350
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 355 360 365
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 370 375 380
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala

ES 2 567 634 T3

385		390		395		400									
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser
				405					410					415	
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu
			420					425					430		
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro
		435					440					445			
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys
	450					455					460				
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp
465					470					475					480
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser
				485					490					495	
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His
			500					505					510		
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser
		515					520					525			
Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala
	530					535					540				
Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg
545					550					555					560
Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr
			565						570					575	
Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu
			580					585					590		
Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro
		595					600					605			
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu
	610					615					620				
Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro
625				630					635						640
Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys
				645					650					655	
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys
			660					665					670		
Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His
		675					680					685			
Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser
	690					695					700				
Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr
705					710					715					720

ES 2 567 634 T3

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
725 730 735
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
740 745 750
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
755 760 765
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
770 775 780
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
785 790 795 800
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
805

<210> 367

<211> 814

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 367

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

ES 2 567 634 T3

180							185					190				
Thr	Gln	Ala	Pro	Gly	Ser	Arg	Gly	Ser	Leu	Gly	Asp	Ser	Asp	Gly	Lys	
		195					200					205				
His	Glu	Thr	Val	Asn	Gln	Glu	Glu	Lys	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	
	210					215					220					
Gly	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	
225					230					235					240	
Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	
				245				250						255		
Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	
			260					265					270			
Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	
		275					280					285				
Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	
	290					295					300					
Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	
305					310					315					320	
Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	
				325					330					335		
Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	
			340					345					350			
Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	
		355					360					365				
Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
	370					375					380					
Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	
385					390					395					400	
Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	
				405					410					415		
Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	
			420					425					430			
Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	
		435					440					445				
Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	
	450					455					460					
Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	
465					470					475					480	
Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	
				485					490					495		
Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	
			500					505					510			

ES 2 567 634 T3

```

Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
    515                                520                    525

Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
    530                                535                    540

Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
    545                                550                    555                    560

Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
    565                                570                    575

Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
    580                                585                    590

Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
    595                                600                    605

Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
    610                                615                    620

Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
    625                                630                    635                    640

Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
    645                                650                    655

Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
    660                                665                    670

Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
    675                                680                    685

Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
    690                                695                    700

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
    705                                710                    715                    720

Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
    725                                730                    735

Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
    740                                745                    750

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
    755                                760                    765

Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
    770                                775                    780

Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
    785                                790                    795                    800

Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
    805                                810

```

<210> 368

<211> 660

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 368

ES 2 567 634 T3

Met	Ala	Arg	Gly	Ser	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Val	Leu	Gly	1	5	10	15
Leu	Trp	Leu	Ala	Leu	Leu	Arg	Ser	Val	Ala	Gly	Glu	Gln	Ala	Pro	Gly	20	25	30	
Thr	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Gly	Ser	Ser	Trp	Ser	Ala	Asp	Leu	Asp	Lys	35	40	45	
Cys	Met	Asp	Cys	Ala	Ser	Cys	Arg	Ala	Arg	Pro	His	Ser	Asp	Phe	Cys	50	55	60	
Leu	Gly	Cys	Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Phe	Asp	Ala	His	Lys	Ser	65	70	75	80
Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	85	90	95	
Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	100	105	110	
Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	115	120	125	
Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	130	135	140	
Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	145	150	155	160
Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	165	170	175	
Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	180	185	190	
Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	195	200	205	
Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	210	215	220	
Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	225	230	235	240
Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	245	250	255	
Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	260	265	270	
Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	275	280	285	
Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	290	295	300	

Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys
 305 310 315 320
 Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala
 325 330 335
 Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu
 340 345 350
 Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val
 355 360 365
 Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe
 370 375 380
 Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val
 385 390 395 400
 Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr
 405 410 415
 Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu
 420 425 430
 Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val
 435 440 445
 Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys
 450 455 460
 Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn
 465 470 475 480
 Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro
 485 490 495
 Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys
 500 505 510
 Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu
 515 520 525
 Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val
 530 535 540
 Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg
 545 550 555 560
 Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu
 565 570 575
 Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser
 580 585 590
 Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val
 595 600 605
 Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp
 610 615 620
 Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu
 625 630 635 640
 Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala
 645 650 655
 Ala Leu Gly Leu
 660

<210> 369

<211> 832

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 567 634 T3

<400> 369

```

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1           5           10           15

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

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
      35           40           45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50           55           60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
 65           70           75           80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
      85           90           95

Leu Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
      100          105          110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
      115          120          125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
      130          135          140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
      145          150          155          160

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
      165          170          175

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
      180          185          190

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
      195          200          205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
      210          215          220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
      225          230          235          240

```

Pro	Met	Thr	Phe	Pro	Pro	Glu	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	
				245					250					255		
Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	
			260					265					270			
Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	
		275					280					285				
Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	
	290					295					300					
Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	
305					310					315					320	
Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	
				325					330					335		
Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	
			340					345					350			
Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	
		355					360					365				
Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	
	370					375					380					
Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	
385					390					395					400	
Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	
				405					410					415		
Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	
			420					425					430			
Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	
		435					440					445				
Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	
	450					455					460					
Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	
465					470					475					480	
Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	
				485					490					495		
Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	
			500					505					510			
Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	
		515					520					525				
Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	
	530					535					540					
Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	
545					550					555					560	

ES 2 567 634 T3

Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met
 565 570 575
 Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu
 580 585 590
 Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys
 595 600 605
 Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe
 610 615 620
 Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
 625 630 635 640
 Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val
 645 650 655
 Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
 660 665 670
 Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
 675 680 685
 Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
 690 695 700
 Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
 705 710 715 720
 Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 725 730 735
 Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
 740 745 750
 Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
 755 760 765
 Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
 770 775 780
 Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
 785 790 795 800
 Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
 805 810 815
 Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 820 825 830

<210> 370

<211> 809

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 370

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1

5

10

15

ES 2 567 634 T3

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335

ES 2 567 634 T3

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Lys Asn Leu Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe
 610 615 620
 Leu Ser Gly Lys Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu
 625 630 635 640
 Asp Ile Ile Cys Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr
 645 650 655
 Lys Leu Tyr Leu Val Arg Pro Glu Gln Ala Ala Ala Cys Ser Thr Val

ES 2 567 634 T3

660	665	670
Leu Asp Pro Asn Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile		
675	680	685
Arg Phe Thr Ile Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu		
690	695	700
Glu Phe Lys Lys His His Asp Tyr Tyr Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly		
705	710	715
Ser Leu Glu Gly Leu Glu Asn Arg Glu Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg		
725	730	735
Thr Met Lys Ile Ile Met Lys Val Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr		
740	745	750
Pro Glu Gln Leu Thr Thr Ser Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr		
755	760	765
Val Lys Met Ala Thr Gln Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp		
770	775	780
Ser Asp Gly Lys His Glu Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro		
785	790	795
Gly Ala Ser Gly Gly Ser Ser Gly Asp		
805		

<210> 371

<211> 809

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 371

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

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His

ES 2 567 634 T3

450		455		460	
Pro Glu Ala Lys Arg Met	Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val				
465	470	475	480		
Leu Asn Gln Leu Cys Val	Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg				
485	490	495			
Val Thr Lys Cys Cys Thr	Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe				
500	505	510			
Ser Ala Leu Glu Val Asp	Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala				
515	520	525			
Glu Thr Phe Thr Phe His	Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu				
530	535	540			
Arg Gln Ile Lys Lys Gln	Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys				
545	550	555	560		
Pro Lys Ala Thr Lys Glu	Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala				
565	570	575			
Ala Phe Val Glu Lys Cys	Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe				
580	585	590			
Ala Glu Glu Gly Lys Lys	Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly				
595	600	605			
Leu Lys Asn Leu Glu Pro	Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe				
610	615	620			
Leu Ser Gly Lys Gly Leu	Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu				
625	630	635	640		
Asp Ile Ile Cys Pro Arg	Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr				
645	650	655			
Lys Leu Tyr Leu Val Arg	Pro Glu Gln Ala Ala Cys Ser Thr Val				
660	665	670			
Leu Asp Pro Asn Val Leu	Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile				
675	680	685			
Arg Phe Thr Ile Lys Phe	Gln Glu Phe Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu				
690	695	700			
Glu Phe Lys Lys His His	Asp Tyr Tyr Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly				
705	710	715	720		
Ser Leu Glu Gly Leu Glu	Asn Arg Glu Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg				
725	730	735			
Thr Met Lys Ile Ile Met	Lys Val Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr				
740	745	750			
Pro Glu Gln Leu Thr Thr	Ser Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr				
755	760	765			
Val Lys Met Ala Thr Gln	Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp				
770	775	780			
Ser Asp Gly Lys His Glu	Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro				
785	790	795	800		
Gly Ala Ser Gly Gly Ser	Ser Gly Asp				
805					

<210> 372

<211> 925

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 372

```

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15

Pro Met Val Trp Ala Met Pro Val Phe Ser Leu Gln Asn Asp Glu Val
      20          25          30

Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Ile Val Lys Val Leu His
      35          40          45

Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser
      50          55          60

Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn
      65          70          75          80

Ser Asp Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu
      85          90          95

Ala Lys Phe Lys Glu Asn Glu Pro Ala Asn Ile Asp Gly Ala Met Glu
      100          105          110

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

Val Asn Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg
      130          135          140

Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Ile Pro Trp Lys His Leu Glu Lys Asn
      145          150          155          160

Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His
      165          170          175

Phe Gly Glu Val Glu Gln Leu Arg Ser Gly Pro Gln Val Ile His Ser
      180          185          190

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

Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Phe Lys Cys
      210          215          220

Met Met Arg Thr Leu Pro Gln Ser Ser Phe Pro Leu Phe Gln Val Leu
      225          230          235          240

Ser Met Gly Ser Ser Leu Met Asp Thr Ile Arg Asp Leu Val Met Glu

```

ES 2 567 634 T3

245										250					255				
Lys	Ser	Ala	Gly	Pro	Tyr	Asp	Lys	Asp	Glu	Tyr	Ser	Pro	Ser	Val	Gln				
			260					265					270						
Lys	Thr	Leu	Cys	Asp	Ile	Gln	Val	Leu	Ser	Leu	Ser	Arg	Val	Pro	Ala				
		275					280					285							
Ile	Glu	Asp	Met	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro	Asn	Ile	His	Tyr	Phe	Asn	Ile				
	290					295					300								
Asp	Met	Ser	Lys	Met	Gly	Leu	Ile	Asn	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Leu	Pro				
305					310					315					320				
Leu	Asp	Asn	Pro	Tyr	Gly	Lys	Ile	Thr	Gly	Thr	Val	Lys	Arg	Lys	Leu				
				325					330					335					
Ser	Ser	Arg	Leu	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys				
			340					345					350						
Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala				
	355						360					365							
Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn				
	370					375					380								
Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu				
385					390					395					400				
Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr				
				405					410					415					
Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala				
			420					425					430						
Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp				
		435					440					445							
Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys				
	450					455					460								
Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr				
465					470					475					480				
Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe				
				485					490					495					
Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala				
			500					505					510						
Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu				
	515						520					525							
Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln				
	530					535					540								
Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser				
545					550					555					560				
Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr				
				565					570					575					

Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 580 585 590
 Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 595 600 605
 Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 610 615 620
 Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 625 630 635 640
 Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
 645 650 655
 Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 660 665 670
 Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 675 680 685
 Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 690 695 700
 Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 705 710 715 720
 Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 725 730 735
 Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 740 745 750
 Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 755 760 765
 Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 770 775 780
 Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 785 790 795 800
 Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 805 810 815
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 820 825 830
 Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 835 840 845
 Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 850 855 860
 Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 865 870 875 880
 Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 885 890 895
 Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 900 905 910
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 915 920 925

<210> 373
 <211> 928
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 373

ES 2 567 634 T3

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

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Met Pro Val Phe Ser Leu Gln Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg
610 615 620

Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Ile Val Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp
625 630 635 640

Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln Leu Thr
645 650 655

Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Ile Ile
660 665 670

Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys Phe Lys
675 680 685

Glu Asn Glu Pro Ala Asn Ile Asp Gly Ala Met Glu Lys Ala Phe Cys
690 695 700

Phe Phe Leu Gln Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys
705 710 715 720

Glu His Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr
725 730 735

Val Glu Glu Ile Pro Trp Lys His Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His
740 745 750

Val His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Gly Glu Val
755 760 765

Glu Gln Leu Arg Ser Gly Pro Gln Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp
770 775 780

Leu Lys Leu Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys
785 790 795 800

Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Phe Lys Cys Met Met Arg Thr
805 810 815

Leu Pro Gln Ser Ser Phe Pro Leu Phe Gln Val Leu Ser Met Gly Ser
820 825 830

Ser Leu Met Asp Thr Ile Arg Asp Leu Val Met Glu Lys Ser Ala Gly
835 840 845

Pro Tyr Asp Lys Asp Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Cys
850 855 860

Asp Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Ala Ile Glu Asp Met
865 870 875 880

Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys
885 890 895

Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro
900 905 910

Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
915 920 925

<210> 374
 5 <211> 1000
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 374

ES 2 567 634 T3

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

ES 2 567 634 T3

Leu Arg Ser Gly Pro Gln Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys
 260 265 270
 Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln
 275 280 285
 Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val
 290 295 300
 Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Lys Ala
 305 310 315 320
 Thr Trp Asp Thr Ile Arg Asp Leu Val Met Glu Lys Ser Ala Gly Pro
 325 330 335
 Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Leu Thr Ser Val Gln Lys Thr Leu Cys Asp
 340 345 350
 Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Ala Ile Glu Asp Met Glu
 355 360 365
 Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met
 370 375 380
 Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr
 385 390 395 400
 Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp
 405 410 415
 Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
 420 425 430
 Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
 435 440 445
 Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
 450 455 460
 Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
 465 470 475 480
 Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
 485 490 495
 Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
 500 505 510
 Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
 515 520 525
 Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
 530 535 540
 Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
 545 550 555 560
 His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
 565 570 575
 Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys

ES 2 567 634 T3

580					585					590						
Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	
595					600					605						
Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	
610					615					620						
Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	
625					630					635					640	
Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	
645					650					655						
His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	
660					665					670						
Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	
675					680					685						
Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	
690					695					700						
Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	
705					710					715					720	
Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	
725					730					735						
Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	
740					745					750						
His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	
755					760					765						
Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	
770					775					780						
Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	
785					790					795					800	
Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	
805					810					815						
Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	
820					825					830						
Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	
835					840					845						
Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	
850					855					860						
Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	
865					870					875					880	
Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	
885					890					895						
Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	
900					905					910						

ES 2 567 634 T3

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
 915 920 925
 Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
 930 935 940
 Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
 945 950 955 960
 Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
 965 970 975
 Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
 980 985 990
 Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 995 1000

<210> 375
 <211> 1003
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 375
 Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys

ES 2 567 634 T3

180					185					190					
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu
	195						200					205			
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys
	210					215					220				
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val
225					230					235					240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser
				245					250					255	
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly
			260					265						270	
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile
	275						280					285			
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu
	290					295					300				
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp
305					310					315					320
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly
			340					345					350		
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val
	355						360					365			
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
	370					375					380				
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu
385					390					395					400
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys
			405					410						415	
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu
		420					425					430			
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val
	435						440					445			
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His
	450					455					460				
Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val
465					470					475					480
Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg
			485						490					495	
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe
			500					505					510		

ES 2 567 634 T3

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Met Glu Lys Phe Ile Trp Tyr Leu Val His Leu Tyr Thr Glu Met
 610 615 620
 Thr Lys Ser Ser Pro Ser Cys Arg Leu Val Ala Ser Cys Gln Thr Val
 625 630 635 640
 Ala Lys Glu Leu Gly Glu Asn Ser Leu Gly Tyr Gly Pro Gly His Tyr
 645 650 655
 Leu Leu Phe Gly Cys Arg Asp Ala Phe Gly Cys Pro Met Pro Gly Leu
 660 665 670
 Phe His Leu Leu Gln Asp Gln Met Ile Gly Ser Leu His Thr Asp Ser
 675 680 685
 Leu Pro Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Glu
 690 695 700
 Met Val Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile
 705 710 715 720
 Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp
 725 730 735
 Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys
 740 745 750
 Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys Phe Lys Glu Asn Asp Pro Ala Asn
 755 760 765
 Ile Asp Gly Ala Met Glu Lys Ala Phe Cys Phe Phe Leu Gln Ile Lys
 770 775 780
 Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser
 785 790 795 800
 Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Met Glu Glu Ile Pro Trp
 805 810 815
 Lys His Leu Gly Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile His
 820 825 830

Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Leu Arg Ser Gly
835 840 845

Pro Gln Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr
850 855 860

Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu
865 870 875 880

Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp
885 890 895

Arg Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Lys Ala Thr Trp Asp Thr
900 905 910

Ile Arg Asp Leu Val Met Glu Lys Ser Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly
915 920 925

Glu Tyr Leu Thr Ser Val Gln Lys Thr Leu Cys Asp Ile Gln Val Leu
930 935 940

Ser Leu Ser Arg Val Pro Ala Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro
945 950 955 960

Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn
965 970 975

Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr
980 985 990

Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
995 1000

<210> 376

<211> 910

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 376

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Pro Met Val Trp Ala Met Ala Asp Tyr His Asn Asn Tyr Lys Lys Asn
20 25 30

Asp Glu Leu Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys
35 40 45

Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val
50 55 60

Ala Thr Ser Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His
65 70 75 80

Gly Asp Asn Ser Asp Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val
85 90 95

His Val Leu Ala Lys Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly
100 105 110

Val Asn Ile Cys Glu Tyr Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg
115 120 125

Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Ile Pro Trp Lys Arg Leu Glu Lys Asn
130 135 140

Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His
145 150 155 160

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

Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu
180 185 190

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

Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Cys Arg
210 215 220

Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Gly Thr Ile Arg Asp Leu Val Leu
225 230 235 240

Glu Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val
245 250 255

Gln Lys Thr Leu Tyr Asp Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro
260 265 270

Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn
275 280 285

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

Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys
305 310 315 320

Leu Ser Ser Arg Leu Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
325 330 335

Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe
340 345 350

Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val
355 360 365

Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
370 375 380

Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
385 390 395 400

Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
405 410 415

Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
420 425 430

Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met

ES 2 567 634 T3

435					440					445					
Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu
450						455					460				
Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
465					470					475					480
Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala
				485					490					495	
Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp
		500						505					510		
Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu
		515					520					525			
Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu
	530					535					540				
Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val
545					550					555					560
Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu
				565					570					575	
Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn
			580					585					590		
Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu
		595					600					605			
Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro
	610					615					620				
Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val
625					630					635					640
Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu
				645					650					655	
Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu
		660						665					670		
Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala
		675					680					685			
Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro
	690					695					700				
Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe
705					710					715					720
Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr
				725					730					735	
Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser
			740					745					750		
Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala
	755						760					765			

Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
770 775 780
Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
785 790 795 800
Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
805 810 815
Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
820 825 830
Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
835 840 845
Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
850 855 860
Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
865 870 875 880
Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
885 890 895
Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
900 905 910

<210> 377

<211> 913

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 377

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

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460

ES 2 567 634 T3

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Met Ala Asp Tyr His Asn Asn Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Leu Glu
 610 615 620
 Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys Val Leu His Ile
 625 630 635 640
 Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val
 645 650 655
 Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser
 660 665 670
 Asp Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala
 675 680 685
 Lys Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys
 690 695 700
 Glu Tyr Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr
 705 710 715 720
 Val Glu Glu Ile Pro Trp Lys Arg Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His
 725 730 735
 Val His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val
 740 745 750
 Glu Gln Leu Arg Ser Gly Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp
 755 760 765
 Leu Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys
 770 775 780
 Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr

ES 2 567 634 T3

785 790 795 800
 Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe
 805 810 815
 Glu Ala Thr Trp Gly Thr Ile Arg Asp Leu Val Leu Glu Lys Phe Ala
 820 825 830
 Gly Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu
 835 840 845
 Tyr Asp Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp
 850 855 860
 Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser
 865 870 875 880
 Lys Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn
 885 890 895
 Pro Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg
 900 905 910

Leu

<210> 378

<211> 1003

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 378

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

ES 2 567 634 T3

145		150		155		160
Ile Pro Thr Asp Thr	Ile Lys Asn Thr Val	His Val Leu Ala Lys Phe				
	165	170			175	
Lys Glu Asn Asp Pro	Ala Asn Ile Asp Gly	Ala Met Glu Lys Ala Phe				
	180	185			190	
Cys Phe Phe Leu Gln	Ile Lys Ser Ile Glu	Ala Phe Gly Val Asn Ile				
	195	200			205	
Cys Glu His Phe Leu	Ser Ser Phe Asn His	Val Ile Arg Ala Gln Val				
	210	215			220	
Tyr Met Glu Glu Ile	Pro Trp Lys His Leu	Gly Lys Asn Gly Val Lys				
	225	230			235	240
His Val His Ala Phe	Ile His Thr Pro Thr	Gly Thr His Phe Cys Glu				
	245	250			255	
Val Glu Gln Leu Arg	Ser Gly Pro Gln Val	Ile His Ser Gly Ile Lys				
	260	265			270	
Asp Leu Lys Val Leu	Lys Thr Thr Gln Ser	Gly Phe Glu Gly Phe Ile				
	275	280			285	
Lys Asp Gln Phe Thr	Thr Leu Pro Glu Val	Lys Asp Arg Cys Phe Ala				
	290	295			300	
Thr Gln Val Tyr Cys	Lys Trp Arg Tyr His	Gln Cys Arg Asp Val Asp				
	305	310			315	320
Phe Lys Ala Thr Trp	Asp Thr Ile Arg Asp	Leu Val Met Glu Lys Ser				
	325	330			335	
Ala Gly Pro Tyr Asp	Lys Gly Glu Tyr Leu	Thr Ser Val Gln Lys Thr				
	340	345			350	
Leu Cys Asp Ile Gln	Val Leu Ser Leu Ser	Arg Val Pro Ala Ile Glu				
	355	360			365	
Asp Met Glu Ile Ser	Leu Pro Asn Ile His	Tyr Phe Asn Ile Asp Met				
	370	375			380	
Ser Lys Met Gly Leu	Ile Asn Lys Glu Glu	Val Leu Leu Pro Leu Asp				
	385	390			395	400
Asn Pro Tyr Gly Lys	Ile Thr Gly Thr Val	Lys Arg Lys Leu Ser Ser				
	405	410			415	
Arg Leu Asp Ala His	Lys Ser Glu Val Ala	His Arg Phe Lys Asp Leu				
	420	425			430	
Gly Glu Glu Asn Phe	Lys Ala Leu Val Leu	Ile Ala Phe Ala Gln Tyr				
	435	440			445	
Leu Gln Gln Cys Pro	Phe Glu Asp His Val	Lys Leu Val Asn Glu Val				
	450	455			460	
Thr Glu Phe Ala Lys	Thr Cys Val Ala Asp	Glu Ser Ala Glu Asn Cys				
	465	470			475	480

ES 2 567 634 T3

Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
 485 490 495
 Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
 500 505 510
 Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
 515 520 525
 Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
 530 535 540
 Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
 545 550 555 560
 Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
 565 570 575
 Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
 580 585 590
 Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys
 595 600 605
 Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe
 610 615 620
 Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
 625 630 635 640
 Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu
 645 650 655
 Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala
 660 665 670
 Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser
 675 680 685
 Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys
 690 695 700
 Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu
 705 710 715 720
 Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn
 725 730 735
 Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr
 740 745 750
 Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala
 755 760 765
 Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro
 770 775 780
 His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu
 785 790 795 800

ES 2 567 634 T3

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

<210> 379

<211> 928

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 379

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

ES 2 567 634 T3

Gly Asp Asn Ser Asp Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val
85 90 95

His Val Leu Ala Lys Phe Lys Glu Asn Glu Pro Ala Asn Ile Asp Gly
100 105 110

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

Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser Phe Asn His
130 135 140

Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Ile Pro Trp Lys His Leu
145 150 155 160

Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr
165 170 175

Gly Thr His Phe Gly Glu Val Glu Gln Leu Arg Ser Gly Pro Gln Val
180 185 190

Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Leu Leu Lys Thr Thr Gln Ser
195 200 205

Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val
210 215 220

Phe Lys Cys Met Met Arg Thr Leu Pro Gln Ser Ser Phe Pro Leu Phe
225 230 235 240

Gln Val Leu Ser Met Gly Ser Ser Leu Met Asp Thr Ile Arg Asp Leu
245 250 255

Val Met Glu Lys Ser Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Asp Glu Tyr Ser Pro
260 265 270

Ser Val Gln Lys Thr Leu Cys Asp Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg
275 280 285

Val Pro Ala Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr
290 295 300

Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val
305 310 315 320

Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys
325 330 335

Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
340 345 350

Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile
355 360 365

Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys
370 375 380

Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu
385 390 395 400

Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys
405 410 415

Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp
420 425 430

Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His
435 440 445

Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp
450 455 460

Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys
465 470 475 480

Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
485 490 495

Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys
500 505 510

Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu
515 520 525

Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala
530 535 540

Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala
545 550 555 560

Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys
565 570 575

Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp
580 585 590

Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
595 600 605

Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys
610 615 620

Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu
625 630 635 640

Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys
645 650 655

Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met
660 665 670

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu
675 680 685

Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys
690 695 700

Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720

Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu

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

<210> 380

<211> 913

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 380

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

ES 2 567 634 T3

85										90					95															
Asn	Thr	Val	His	Val	Leu	Ala	Lys	Phe	Lys	Gly	Ile	Lys	Ser	Ile	Glu															
			100					105					110																	
Ala	Phe	Gly	Val	Asn	Ile	Cys	Glu	Tyr	Phe	Leu	Ser	Ser	Phe	Asn	His															
		115					120					125																		
Val	Ile	Arg	Ala	Gln	Val	Tyr	Val	Glu	Glu	Ile	Pro	Trp	Lys	Arg	Leu															
		130				135					140																			
Glu	Lys	Asn	Gly	Val	Lys	His	Val	His	Ala	Phe	Ile	His	Thr	Pro	Thr															
145					150					155					160															
Gly	Thr	His	Phe	Cys	Glu	Val	Glu	Gln	Leu	Arg	Ser	Gly	Pro	Pro	Val															
				165					170						175															
Ile	His	Ser	Gly	Ile	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Thr	Thr	Gln	Ser															
			180					185						190																
Gly	Phe	Glu	Gly	Phe	Ile	Lys	Asp	Gln	Phe	Thr	Thr	Leu	Pro	Glu	Val															
		195					200					205																		
Lys	Asp	Arg	Cys	Phe	Ala	Thr	Gln	Val	Tyr	Cys	Lys	Trp	Arg	Tyr	His															
	210					215					220																			
Gln	Cys	Arg	Asp	Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Thr	Trp	Gly	Thr	Ile	Arg	Asp															
225					230					235					240															
Leu	Val	Leu	Glu	Lys	Phe	Ala	Gly	Pro	Tyr	Asp	Lys	Gly	Glu	Tyr	Ser															
				245					250					255																
Pro	Ser	Val	Gln	Lys	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ile	Gln	Val	Leu	Ser	Leu	Ser															
			260					265					270																	
Arg	Val	Pro	Glu	Ile	Glu	Asp	Met	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro	Asn	Ile	His															
		275					280					285																		
Tyr	Phe	Asn	Ile	Asp	Met	Ser	Lys	Met	Gly	Leu	Ile	Asn	Lys	Glu	Glu															
		290				295					300																			
Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asp	Asn	Pro	Tyr	Gly	Lys	Ile	Thr	Gly	Thr	Val															
305					310					315					320															
Lys	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala															
				325					330					335																
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu															
			340					345					350																	
Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val															
		355					360					365																		
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp															
						375					380																			
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp															
385					390					395					400															
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala															
				405					410					415																

ES 2 567 634 T3

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 420 425 430
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 435 440 445
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 450 455 460
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 465 470 475 480
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 485 490 495
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 500 505 510
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 515 520 525
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 530 535 540
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 545 550 555 560
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 565 570 575
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 580 585 590
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 595 600 605
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 610 615 620
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 625 630 635 640
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 645 650 655
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 660 665 670
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 675 680 685
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 690 695 700
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 705 710 715 720
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 725 730 735

ES 2 567 634 T3

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
740 745 750
Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
755 760 765
Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
770 775 780
Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
785 790 795 800
Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
805 810 815
Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
820 825 830
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
835 840 845
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
850 855 860
Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
865 870 875 880
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
885 890 895
Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
900 905 910

Leu

<210> 381

<211> 805

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 381

Met Asn Ile Phe Tyr Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly
1 5 10 15
Leu Glu His Thr His Arg Arg Gly Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His
20 25 30
Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe
35 40 45
Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro
50 55 60
Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys
65 70 75 80
Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His
85 90 95

Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	100	105	110
Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	115	120	125
Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	130	135	140
Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	145	150	155
Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	165	170	175
Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	180	185	190
Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	195	200	205
Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	210	215	220
Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	225	230	235
Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	245	250	255
Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	260	265	270
Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	275	280	285
Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	290	295	300
Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	305	310	315
Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	325	330	335
Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	340	345	350
Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	355	360	365
Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	370	375	380
Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	385	390	395
Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	405	410	415

ES 2 567 634 T3

Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
 420 425 430
 Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
 435 440 445
 Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser
 450 455 460
 Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
 465 470 475 480
 Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
 485 490 495
 Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn
 500 505 510
 Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro
 515 520 525
 Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr
 530 535 540
 Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu
 545 550 555 560
 Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val
 565 570 575
 Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp
 580 585 590
 Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser
 595 600 605
 Gln Ala Ala Leu Gly Leu Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
 610 615 620
 Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
 625 630 635 640
 Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
 660 665 670
 Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
 675 680 685
 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
 690 695 700
 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
 705 710 715 720
 Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
 725 730 735
 Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile

ES 2 567 634 T3

740 745 750
Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
755 760 765
Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
770 775 780
Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
785 790 795 800
Gly Ser Cys Gly Phe
805

<210> 382
<211> 191
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 382
Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
1 5 10 15
Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
20 25 30
Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
35 40 45
Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
50 55 60
Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
65 70 75 80
Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
85 90 95
Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
100 105 110
Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
115 120 125
Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
130 135 140
Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
145 150 155 160
Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
165 170 175
Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
180 185 190

<210> 383
<211> 191
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 383

ES 2 567 634 T3

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

<210> 384

<211> 191

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 384

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
 1 5 10 15
 Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
 20 25 30
 Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
 35 40 45
 Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
 50 55 60

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

<210> 385

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 385

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

10 <210> 386

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 386

ES 2 567 634 T3

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

<210> 387
 <211> 60
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 387
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His Gly
 20 25 30
 Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala
 35 40 45
 Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 50 55 60

<210> 388
 <211> 32
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 388
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30

<210> 389
 <211> 32
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 389
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30

<210> 390
 <211> 60
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

<400> 390

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His Gly
 20 25 30
 Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala
 35 40 45
 Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 50 55 60
 <210> 391
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 391
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu
 20 25
 <210> 392
 <211> 32
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 392
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30
 <210> 393
 <211> 32
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 393
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30
 <210> 394
 <211> 32
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 394
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 25 20 25 30
 <210> 395
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 395
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30

<210> 396
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 396
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Gly Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30
 <210> 397
 10 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 397
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu
 20 25
 15 <210> 398
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 398
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Gly Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30
 20 <210> 399
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 399
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30
 <210> 400
 <211> 32
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 400
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30
 <210> 401
 <211> 30
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 401
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg
 20 25 30

<210> 402
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 402
 Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val
 20 25 30
 Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu
 35 40 45
 Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser
 50 55 60
 Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala
 85 90 95
 Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys
 100 105 110
 Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser
 115 120 125
 Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu
 130 135 140
 Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
 145 150

<210> 403
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 403
 Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val
 20 25 30
 Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu
 35 40 45
 Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser
 50 55 60
 Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala
 85 90 95
 Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys
 100 105 110
 Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser
 115 120 125
 Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu
 130 135 140
 Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
 145 150

15 <210> 404

<211> 151
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 404

```
Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ala
  1           5           10           15

Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val
      20           25           30

Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu
      35           40           45

Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser
      50           55           60

Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val
      65           70           75           80

Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala
      85           90           95

Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys
      100          105          110

Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser
      115          120          125

Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu
      130          135          140

Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
5 145          150
```

<210> 405
<211> 151
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 405

```
Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ala
  1           5           10           15

Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val
      20           25           30

Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu
      35           40           45

Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser
      50           55           60

Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val
      65           70           75           80

Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala
      85           90           95

Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys
      100          105          110

Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser
      115          120          125

Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu
      130          135          140

Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
10 145          150
```

<210> 406
<211> 151

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 406

```

Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ala
 1           5           10           15

Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val
          20           25           30

Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu
          35           40           45

Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser
          50           55           60

Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val
          65           70           75           80

Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala
5              85              90              95

Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys
          100           105           110

Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser
          115           120           125

Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu
          130           135           140

Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
145           150

```

<210> 407
<211> 151
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 407

```

Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ala
 1           5           10           15

Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val
          20           25           30

Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu
          35           40           45

Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser
          50           55           60

Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val
          65           70           75           80

Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala
              85              90              95

Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys
          100           105           110

Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser
          115           120           125

Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu
          130           135           140

Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
145           150

```

<210> 408
<211> 126

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 408
Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu Thr Leu Leu

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

<210> 409
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10
<400> 409
Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu Thr Leu Leu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Pro Ser Glu Ala Lys Pro Gly Ala Pro Pro Lys Val Pro
20 25 30
Arg Thr Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ala Glu Pro Gln Ala Ala Gly Gly
35 40 45
Gly Gln Lys Lys Gly Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ala Asn Leu
50 55 60
Lys Gly Asp Arg Ser Arg Leu Leu Arg Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys
65 70 75 80
Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg
85 90 95
Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly
100 105 110
Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
115 120 125

<210> 410
<211> 38
<212> PRT
<213> Dendroaspis angusticeps

<400> 410

Glu Val Lys Tyr Asp Pro Cys Phe Gly His Lys Ile Asp Arg Ile Asn
 1 5 10 15
 His Val Ser Asn Leu Gly Cys Pro Ser Leu Arg Asp Pro Arg Pro Asn
 20 25 30
 Ala Pro Ser Thr Ser Ala
 35
 <210> 411
 <211> 38
 <212> PRT
 5 <213> Dendroaspis angusticeps
 <400> 411
 Glu Val Lys Tyr Asp Pro Cys Phe Gly His Lys Ile Asp Arg Ile Asn
 1 5 10 15
 His Val Ser Asn Leu Gly Cys Pro Ser Leu Arg Asp Pro Arg Pro Asn
 20 25 30
 Ala Pro Ser Thr Ser Ala
 35
 <210> 412
 <211> 30
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 412
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg
 20 25 30
 <210> 413
 <211> 32
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 413
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30
 20 <210> 414
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 414
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 25 20 25 30
 <210> 415
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 415
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30

<210> 416
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 416
 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30

<210> 417
 <211> 303
 <212> PRT

10 <213> Rattus norvegicus

<400> 417
 Met Ala His Tyr His Asp Asp Tyr Gly Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe
 1 5 10 15
 Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys Val Leu His Ile Gln
 20 25 30
 Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln
 35 40 45
 Leu Thr Leu Arg Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp
 50 55 60
 Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys
 65 70 75 80
 Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Thr Phe Ala Met Asn Ile Cys Glu
 85 90 95
 His Phe Leu Ser Ser Phe Ser His Val Thr Arg Ala His Val Tyr Val
 100 105 110
 Glu Glu Val Pro Trp Lys Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val

ES 2 567 634 T3

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

<210> 418

<211> 303

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 418

Met Ala His Tyr His Asp	Asp Tyr Gly Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe
1	5 10 15
Val Arg Thr Gly Tyr Gly	Lys Asp Met Val Lys Val Leu His Ile Gln
	20 25 30
Arg Asp Gly Lys Tyr His	Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln
	35 40 45
Leu Thr Leu Arg Ser Lys	Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp
	50 55 60
Ile Ile Pro Thr Asp Thr	Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys
	65 70 75 80
Phe Lys Gly Ile Lys Ser	Ile Glu Thr Phe Ala Met Asn Ile Cys Glu
	85 90 95

ES 2 567 634 T3

His Phe Leu Ser Ser Phe Ser His Val Thr Arg Ala His Val Tyr Val
100 105 110

Glu Glu Val Pro Trp Lys Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val
115 120 125

His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Asp Val Glu
130 135 140

Gln Val Arg Asn Gly Pro Pro Ile Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu
145 150 155 160

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

Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln
180 185 190

Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr Gln Asn Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala
195 200 205

Thr Trp Gly Ala Val Arg Asp Ile Val Leu Lys Lys Phe Ala Gly Pro
210 215 220

Tyr Asp Arg Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr Asp
225 230 235 240

Ile Gln Val Leu Thr Leu Ser Gln Leu Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu
245 250 255

Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met
260 265 270

Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr
275 280 285

Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Arg Arg Lys Leu Pro Ser Arg Leu
290 295 300

<210> 419

<211> 410

<212> PRT

5 <213> Mycoplasma arginini

<400> 419

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu
50 55 60

Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala
65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu
85 90 95

Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val
100 105 110

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

Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala
130 135 140

Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
145 150 155 160

Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg
165 170 175

Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser
180 185 190

Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu
195 200 205

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

Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu
225 230 235 240

Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile
245 250 255

Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr
260 265 270

Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
275 280 285

Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala
290 295 300

Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln
305 310 315 320

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

Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
340 345 350

Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu
355 360 365

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
370 375 380

His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp

405

410

<210> 420

<211> 410

<212> PRT

<213> Mycoplasma arginini

<400> 420

ES 2 567 634 T3

Met	Ser	Val	Phe	Asp	Ser	Lys	Phe	Lys	Gly	Ile	His	Val	Tyr	Ser	Glu	1	5	10	15
Ile	Gly	Glu	Leu	Glu	Ser	Val	Leu	Val	His	Glu	Pro	Gly	Arg	Glu	Ile	20	25	30	
Asp	Tyr	Ile	Thr	Pro	Ala	Arg	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Phe	Ser	Ala	Ile	35	40	45	
Leu	Glu	Ser	His	Asp	Ala	Arg	Lys	Glu	His	Lys	Gln	Phe	Val	Ala	Glu	50	55	60	
Leu	Lys	Ala	Asn	Asp	Ile	Asn	Val	Val	Glu	Leu	Ile	Asp	Leu	Val	Ala	65	70	75	80
Glu	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ala	Ser	Gln	Glu	Ala	Lys	Asp	Lys	Leu	Ile	Glu	85	90	95	
Glu	Phe	Leu	Glu	Asp	Ser	Glu	Pro	Val	Leu	Ser	Glu	Glu	His	Lys	Val	100	105	110	
Val	Val	Arg	Asn	Phe	Leu	Lys	Ala	Lys	Lys	Thr	Ser	Arg	Lys	Leu	Val	115	120	125	
Glu	Ile	Met	Met	Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	Tyr	Asp	Leu	Gly	Ile	Glu	Ala	130	135	140	
Asp	His	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Pro	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr	Arg	145	150	155	160
Asp	Pro	Phe	Ala	Ser	Val	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Ile	His	Tyr	Met	Arg	165	170	175	
Tyr	Lys	Val	Arg	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Phe	Ser	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	180	185	190	
Asn	His	Pro	Lys	Leu	Ile	Asn	Thr	Pro	Trp	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Ser	Leu	195	200	205	
Lys	Leu	Ser	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	Ile	Tyr	Asn	Asn	Asp	Thr	210	215	220	
Leu	Val	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Arg	Thr	Asp	Leu	Gln	Thr	Val	Thr	Leu	225	230	235	240
Leu	Ala	Lys	Asn	Ile	Val	Ala	Asn	Lys	Glu	Cys	Glu	Phe	Lys	Arg	Ile	245	250	255	
Val	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Trp	Thr	Asn	Leu	Met	His	Leu	Asp	Thr	260	265	270	

ES 2 567 634 T3

Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
 275 280 285
 Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala
 290 295 300
 Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln
 305 310 315 320
 Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly
 325 330 335
 Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
 340 345 350
 Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu
 355 360 365
 Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
 370 375 380
 His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
 385 390 395 400
 Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405 410

<210> 421

<211> 410

<212> PRT

5 <213> Mycoplasma arginini

<400> 421

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

ES 2 567 634 T3

Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
 145 150 155 160
 Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg
 165 170 175
 Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser
 180 185 190
 Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu
 195 200 205
 Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr
 210 215 220
 Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu
 225 230 235 240
 Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile
 245 250 255
 Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr
 260 265 270
 Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
 275 280 285
 Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala
 290 295 300
 Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln
 305 310 315 320
 Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly
 325 330 335
 Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
 340 345 350
 Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu
 355 360 365
 Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
 370 375 380
 His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
 385 390 395 400
 Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405 410

<210> 422

<211> 410

<212> PRT

5 <213> Mycoplasma arginini

<400> 422

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu

ES 2 567 634 T3

1	5	10	15
Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile	20	25	30
Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile	35	40	45
Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu	50	55	60
Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala	65	70	75
Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu	85	90	95
Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val	100	105	110
Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr Ser Arg Lys Leu Val	115	120	125
Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala	130	135	140
Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg	145	150	155
Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg	165	170	175
Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser	180	185	190
Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu	195	200	205
Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr	210	215	220
Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu	225	230	235
Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile	245	250	255
Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr	260	265	270
Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala	275	280	285
Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala	290	295	300
Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln	305	310	315
Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly	325	330	335

ES 2 567 634 T3

Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
 340 345 350
 Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu
 355 360 365
 Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
 370 375 380
 His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
 385 390 395 400
 Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405 410

<210> 423

<211> 129

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 423

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

Gln

<210> 424

<211> 497

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 424

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15
 Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro

ES 2 567 634 T3

20					25					30					
Ala	Leu	Gly	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr	Glu	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Arg	Arg
	35						40					45			
Met	Glu	Leu	Ser	Met	Gly	Pro	Ile	Gln	Ala	Asn	His	Thr	Gly	Thr	Gly
	50					55					60				
Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Lys	Phe	Gln	Lys	Val	Lys	Gly
	65					70					75				80
Phe	Gly	Gly	Ala	Met	Thr	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu
				85					90					95	
Ser	Pro	Pro	Ala	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ser	Glu	Glu
			100					105					110		
Gly	Ile	Gly	Tyr	Asn	Ile	Ile	Arg	Val	Pro	Met	Ala	Ser	Cys	Asp	Phe
		115					120					125			
Ser	Ile	Arg	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Pro	Asp	Asp	Phe	Gln	Leu
	130					135					140				
His	Asn	Phe	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Asp	Thr	Lys	Leu	Lys	Ile	Pro	Leu
	145			150							155				160
Ile	His	Arg	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gln	Arg	Pro	Val	Ser	Leu	Leu	Ala
				165					170					175	
Ser	Pro	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Trp	Leu	Lys	Thr	Asn	Gly	Ala	Val	Asn
			180					185					190		
Gly	Lys	Gly	Ser	Leu	Lys	Gly	Gln	Pro	Gly	Asp	Ile	Tyr	His	Gln	Thr
		195					200					205			
Trp	Ala	Arg	Tyr	Phe	Val	Lys	Phe	Leu	Asp	Ala	Tyr	Ala	Glu	His	Lys
	210					215					220				
Leu	Gln	Phe	Trp	Ala	Val	Thr	Ala	Glu	Asn	Glu	Pro	Ser	Ala	Gly	Leu
	225			230					235						240
Leu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe	Gln	Cys	Leu	Gly	Phe	Thr	Pro	Glu	His	Gln
				245					250					255	
Arg	Asp	Phe	Ile	Ala	Arg	Asp	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Ala	Asn	Ser	Thr
		260						265					270		
His	His	Asn	Val	Arg	Leu	Leu	Met	Leu	Asp	Asp	Gln	Arg	Leu	Leu	Leu
		275					280					285			
Pro	His	Trp	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Thr	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Tyr
	290					295					300				
Val	His	Gly	Ile	Ala	Val	His	Trp	Tyr	Leu	Asp	Phe	Leu	Ala	Pro	Ala
	305			310					315					320	
Lys	Ala	Thr	Leu	Gly	Glu	Thr	His	Arg	Leu	Phe	Pro	Asn	Thr	Met	Leu
				325					330					335	
Phe	Ala	Ser	Glu	Ala	Cys	Val	Gly	Ser	Lys	Phe	Trp	Glu	Gln	Ser	Val
			340					345					350		

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365
 Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380
 Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400
 Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415
 Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430
 Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445
 Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460
 Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480
 Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 425

<211> 497

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 425

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

ES 2 567 634 T3

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
130 135 140

His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
225 230 235 240

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
305 310 315 320

Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
465 470 475 480

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

Gln

<210> 426

<211> 497

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 426

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

ES 2 567 634 T3

225 230 235 240
 Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
 245 250 255
 Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270
 His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285
 Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300
 Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
 305 310 315 320
 Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335
 Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350
 Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365
 Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380
 Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400
 Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415
 Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430
 Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445
 Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460
 Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480
 Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 427

<211> 497

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 427

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys

ES 2 567 634 T3

1	5	10	15
Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro	20	25	30
Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg	35	40	45
Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly	50	55	60
Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly	65	70	75
Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu	85	90	95
Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu	100	105	110
Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe	115	120	125
Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu	130	135	140
His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu	145	150	155
Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala	165	170	175
Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn	180	185	190
Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr	195	200	205
Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys	210	215	220
Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu	225	230	235
Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln	245	250	255
Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr	260	265	270
His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu	275	280	285
Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr	290	295	300
Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala	305	310	315
Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu	325	330	335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
340 345 350
Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
355 360 365
Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
370 375 380
Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
385 390 395 400
Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
405 410 415
Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
420 425 430
Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
435 440 445
Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
450 455 460
Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
465 470 475 480
Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
485 490 495

Gln

<210> 428

<211> 52

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 428

Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
1 5 10 15

Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
20 25 30

Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
35 40 45

Pro Gln Gly Tyr
50

<210> 429

<211> 52

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 429

Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
1 5 10 15

Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
20 25 30

Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
35 40 45

Pro Gln Gly Tyr
50

15 <210> 430
<211> 52
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 430
Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
1 5 10 15
Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
20 25 30
Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
35 40 45
Pro Gln Gly Tyr
50

<210> 431
<211> 52
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 431
Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
1 5 10 15
Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
20 25 30
Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
35 40 45
Pro Gln Gly Tyr
50

<210> 432
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 432
Met Asn Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Leu Phe Leu Cys Ala Thr
1 5 10 15
His Phe Gly Glu Pro Leu Glu Lys Val Ala Ser Val Gly Asn Ser Arg
20 25 30
Pro Thr Gly Gln Gln Leu Glu Ser Leu Gly Leu Leu Ala Pro Gly Glu
35 40 45
Gln Ser Leu Pro Cys Thr Glu Arg Lys Pro Ala Ala Thr Ala Arg Leu
50 55 60
Ser Arg Arg Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser
65 70 75 80
Pro Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala
85 90 95
Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr
100 105 110
Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe Gly Lys Arg Glu Ala Ala Pro
115 120 125
Gly Asn His Gly Arg Ser Ala Gly Arg Gly Trp Gly Ala Gly Ala Gly
130 135 140

Gln
145
<210> 433
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 433

ES 2 567 634 T3

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

Gln
 145

<210> 434

<211> 346

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 434

ES 2 567 634 T3

```

Met Ala Arg Pro Gly Gln Arg Trp Leu Gly Lys Trp Leu Val Ala Met
 1           5           10           15

Val Val Trp Ala Leu Cys Arg Leu Ala Thr Pro Leu Ala Lys Asn Leu
      20           25           30

Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gly Lys
      35           40           45

Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu Asp Ile Ile Cys
      50           55           60

Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr Lys Leu Tyr Leu
      65           70           75           80

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

Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile
      100          105          110

Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys
      115          120          125

His His Asp Tyr Tyr Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly
      130          135          140

Leu Glu Asn Arg Glu Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile
      145          150          155          160

Ile Met Lys Val Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu
      165          170          175

Thr Thr Ser Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala
      180          185          190

Thr Gln Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys
      195          200          205

His Glu Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly
      210          215          220

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

Phe Ala Ala Val Gly Ala Gly Cys Val Ile Phe Leu Leu Ile Ile Ile
      245          250          255

Phe Leu Thr Val Leu Leu Leu Lys Leu Arg Lys Arg His Arg Lys His
      260          265          270

Thr Gln Gln Arg Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ala Ser Pro
      275          280          285

Lys Gly Gly Ser Gly Thr Ala Gly Thr Glu Pro Ser Asp Ile Ile Ile
      290          295          300

Pro Leu Arg Thr Thr Glu Asn Asn Tyr Cys Pro His Tyr Glu Lys Val
      305          310          315          320

Ser Gly Asp Tyr Gly His Pro Val Tyr Ile Val Gln Glu Met Pro Pro
      325          330          335

Gln Ser Pro Ala Asn Ile Tyr Tyr Lys Val
      340          345

```

<210> 435
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 435

ES 2 567 634 T3

```

Met Ala Arg Pro Gly Gln Arg Trp Leu Gly Lys Trp Leu Val Ala Met
 1          5          10          15

Val Val Trp Ala Leu Cys Arg Leu Ala Thr Pro Leu Ala Lys Asn Leu
 20          25          30

Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gly Lys
 35          40          45

Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu Asp Ile Ile Cys
 50          55          60

Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr Lys Leu Tyr Leu
 65          70          75          80

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

Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile
100          105          110

Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys
115          120          125

His His Asp Tyr Tyr Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly
130          135          140

Leu Glu Asn Arg Glu Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile
145          150          155          160

Ile Met Lys Val Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu
165          170          175

Thr Thr Ser Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala
180          185          190

Thr Gln Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys
195          200          205

His Glu Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly
210          215          220

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

Phe Ala Ala Val Gly Ala Gly Cys Val Ile Phe Leu Leu Ile Ile Ile
245          250          255

Phe Leu Thr Val Leu Leu Leu Lys Leu Arg Lys Arg His Arg Lys His
260          265          270

Thr Gln Gln Arg Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ala Ser Pro
275          280          285

Lys Gly Gly Ser Gly Thr Ala Gly Thr Glu Pro Ser Asp Ile Ile Ile
290          295          300

Pro Leu Arg Thr Thr Glu Asn Asn Tyr Cys Pro His Tyr Glu Lys Val
305          310          315          320

Ser Gly Asp Tyr Gly His Pro Val Tyr Ile Val Gln Glu Met Pro Pro
325          330          335

Gln Ser Pro Ala Asn Ile Tyr Tyr Lys Val
340          345

```

<210> 436
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 436

ES 2 567 634 T3

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

Gln

<210> 437

<211> 247

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 437

ES 2 567 634 T3

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

<210> 438

<211> 346

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 438

ES 2 567 634 T3

```

Met Ala Arg Pro Gly Gln Arg Trp Leu Gly Lys Trp Leu Val Ala Met
 1           5           10           15

Val Val Trp Ala Leu Cys Arg Leu Ala Thr Pro Leu Ala Lys Asn Leu
      20           25           30

Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gly Lys
      35           40           45

Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu Asp Ile Ile Cys
      50           55           60

Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr Lys Leu Tyr Leu
      65           70           75           80

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

Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile
      100          105          110

Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys
      115          120          125

His His Asp Tyr Tyr Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly
      130          135          140

Leu Glu Asn Arg Glu Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile
      145          150          155          160

Ile Met Lys Val Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu
      165          170          175

Thr Thr Ser Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala
      180          185          190

Thr Gln Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys
      195          200          205

His Glu Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly
      210          215          220

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

Phe Ala Ala Val Gly Ala Gly Cys Val Ile Phe Leu Leu Ile Ile Ile
      245          250          255

Phe Leu Thr Val Leu Leu Leu Lys Leu Arg Lys Arg His Arg Lys His
      260          265          270

Thr Gln Gln Arg Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ala Ser Pro
      275          280          285

Lys Gly Gly Ser Gly Thr Ala Gly Thr Glu Pro Ser Asp Ile Ile Ile
      290          295          300

Pro Leu Arg Thr Thr Glu Asn Asn Tyr Cys Pro His Tyr Glu Lys Val
      305          310          315          320

Ser Gly Asp Tyr Gly His Pro Val Tyr Ile Val Gln Glu Met Pro Pro
      325          330          335

Gln Ser Pro Ala Asn Ile Tyr Tyr Lys Val
      340          345

```

<210> 439

<211> 346

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 439

Met Ala Arg Pro Gly Gln Arg Trp Leu Gly Lys Trp Leu Val Ala Met
1 5 10 15

Val Val Trp Ala Leu Cys Arg Leu Ala Thr Pro Leu Ala Lys Asn Leu
20 25 30

Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gly Lys
35 40 45

Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu Asp Ile Ile Cys
50 55 60

Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr Lys Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile
100 105 110

Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys
115 120 125

His His Asp Tyr Tyr Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly
130 135 140

Leu Glu Asn Arg Glu Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile
145 150 155 160

Ile Met Lys Val Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu
165 170 175

Thr Thr Ser Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala
180 185 190

Thr Gln Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys
195 200 205

His Glu Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly
210 215 220

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

Phe Ala Ala Val Gly Ala Gly Cys Val Ile Phe Leu Leu Ile Ile Ile
245 250 255

Phe Leu Thr Val Leu Leu Leu Lys Leu Arg Lys Arg His Arg Lys His
260 265 270

Thr Gln Gln Arg Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ala Ser Pro
275 280 285

Lys Gly Gly Ser Gly Thr Ala Gly Thr Glu Pro Ser Asp Ile Ile Ile
290 295 300

Pro Leu Arg Thr Thr Glu Asn Asn Tyr Cys Pro His Tyr Glu Lys Val
305 310 315 320

Ser Gly Asp Tyr Gly His Pro Val Tyr Ile Val Gln Glu Met Pro Pro
325 330 335

Gln Ser Pro Ala Asn Ile Tyr Tyr Lys Val
340 345

<210> 440
<211> 319
<212> PRT
<213> Pan troglodytes
<220>
<221> MUTAGEN

<222> (30)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<400> 440

```

Met Pro Val Phe Ser Leu Gln Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr
 1          5          10          15

Gly Tyr Gly Lys Asp Ile Val Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly
      20          25          30

Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln Leu Thr Leu
      35          40          45

Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Ile Ile Pro
      50          55          60

Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys Phe Lys Glu
      65          70          75          80

Asn Glu Pro Ala Asn Ile Asp Gly Ala Met Glu Lys Ala Phe Cys Phe
      85          90          95

Phe Leu Gln Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu
      100          105          110

His Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val
      115          120          125

Glu Glu Ile Pro Trp Lys His Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val
      130          135          140

His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Gly Glu Val Glu
      145          150          155          160

Gln Leu Arg Ser Gly Pro Gln Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu
      165          170          175

Lys Leu Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp
      180          185          190

Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Phe Lys Cys Met Met Arg Thr Leu
      195          200          205

Pro Gln Ser Ser Phe Pro Leu Phe Gln Val Leu Ser Met Gly Ser Ser
      210          215          220

Leu Met Asp Thr Ile Arg Asp Leu Val Met Glu Lys Ser Ala Gly Pro
      225          230          235          240

Tyr Asp Lys Asp Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Cys Asp
      245          250          255

Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Ala Ile Glu Asp Met Glu
      260          265          270

Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met
      275          280          285

Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr
      290          295          300

Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
      305          310          315

```

<210> 441

<211> 319

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (30)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<400> 441

```

Met Pro Val Phe Ser Leu Gln Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr
 1          5          10          15

Gly Tyr Gly Lys Asp Ile Val Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly
 20          25          30

Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln Leu Thr Leu
 35          40          45

Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Ile Ile Pro
 50          55          60

Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys Phe Lys Glu
 65          70          75          80

Asn Glu Pro Ala Asn Ile Asp Gly Ala Met Glu Lys Ala Phe Cys Phe
 85          90          95

Phe Leu Gln Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu
100          105          110

His Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val
115          120          125

Glu Glu Ile Pro Trp Lys His Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val
130          135          140

His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Gly Glu Val Glu
145          150          155          160

Gln Leu Arg Ser Gly Pro Gln Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu
165          170          175

Lys Leu Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp
180          185          190

Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Phe Lys Cys Met Met Arg Thr Leu
195          200          205

Pro Gln Ser Ser Phe Pro Leu Phe Gln Val Leu Ser Met Gly Ser Ser
210          215          220

Leu Met Asp Thr Ile Arg Asp Leu Val Met Glu Lys Ser Ala Gly Pro
225          230          235          240

Tyr Asp Lys Asp Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Cys Asp
245          250          255

Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Ala Ile Glu Asp Met Glu
260          265          270

Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met
275          280          285

Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr
290          295          300

Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
305          310          315

```

<210> 442

<211> 394

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (104)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (277)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

5 <400> 442

```

Met Glu Lys Phe Ile Trp Tyr Leu Val His Leu Tyr Thr Glu Met Thr
      1              5              10              15

Lys Ser Ser Pro Ser Cys Arg Leu Val Ala Ser Cys Gln Thr Val Ala
      20              25              30

Lys Glu Leu Gly Glu Asn Ser Leu Gly Tyr Gly Pro Gly His Tyr Leu
      35              40              45

Leu Phe Gly Cys Arg Asp Ala Phe Gly Cys Pro Met Pro Gly Leu Phe
      50              55              60

His Leu Leu Gln Asp Gln Met Ile Gly Ser Leu His Thr Asp Ser Leu
      65              70              75              80

Pro Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Glu Met
      85              90              95

Val Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys
      100             105             110

Glu Val Ala Thr Ser Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr
      115             120             125

Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn
      130             135             140

Thr Val His Val Leu Ala Lys Phe Lys Glu Asn Asp Pro Ala Asn Ile
      145             150             155             160

Asp Gly Ala Met Glu Lys Ala Phe Cys Phe Phe Leu Gln Ile Lys Ser
      165             170             175

Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser Phe
      180             185             190

Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Met Glu Glu Ile Pro Trp Lys
      195             200             205

His Leu Gly Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile His Thr
      210             215             220

Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Leu Arg Ser Gly Pro
      225             230             235             240

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

Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro
      260             265             270

Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg
      275             280             285

Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Lys Ala Thr Trp Asp Thr Ile
      290             295             300

Arg Asp Leu Val Met Glu Lys Ser Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly Glu
      305             310             315             320

Tyr Leu Thr Ser Val Gln Lys Thr Leu Cys Asp Ile Gln Val Leu Ser
      325             330             335

```


Leu Ser Arg Val Pro Ala Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn
340 345 350
Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn Lys
355 360 365
Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr Gly
370 375 380
Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
385 390

<210> 443

<211> 394

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (104)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

10 <220>

<221> MUTAGEN

<222> (277)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<400> 443

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

15

ES 2 567 634 T3

Asp Gly Ala Met Glu Lys Ala Phe Cys Phe Phe Leu Gln Ile Lys Ser
 165 170 175
 Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser Phe
 180 185 190
 Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Met Glu Glu Ile Pro Trp Lys
 195 200 205
 His Leu Gly Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile His Thr
 210 215 220
 Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Leu Arg Ser Gly Pro
 225 230 235 240
 Gln Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr Thr
 245 250 255
 Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg
 275 280 285
 Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Lys Ala Thr Trp Asp Thr Ile
 290 295 300
 Arg Asp Leu Val Met Glu Lys Ser Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly Glu
 305 310 315 320
 Tyr Leu Thr Ser Val Gln Lys Thr Leu Cys Asp Ile Gln Val Leu Ser
 325 330 335
 Leu Ser Arg Val Pro Ala Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn
 340 345 350
 Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn Lys
 355 360 365
 Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr Gly
 370 375 380
 Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
 385 390

<210> 444

<211> 304

<212> PRT

5 <213> Papio hamadryas

<400> 444

Met Ala Asp Tyr His Asn Asn Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Leu Glu Phe
 1 5 10 15
 Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys Val Leu His Ile Gln
 20 25 30
 Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln
 35 40 45

ES 2 567 634 T3

Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp
 50 55 60
 Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys
 65 70 75 80
 Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu
 85 90 95
 Tyr Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val
 100 105 110
 Glu Glu Ile Pro Trp Lys Arg Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val
 115 120 125
 His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu
 130 135 140
 Gln Leu Arg Ser Gly Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu
 145 150 155 160
 Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp
 165 170 175
 Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln
 180 185 190
 Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Glu
 195 200 205
 Ala Thr Trp Gly Thr Ile Arg Asp Leu Val Leu Glu Lys Phe Ala Gly
 210 215 220
 Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr
 225 230 235 240
 Asp Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met
 245 250 255
 Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys
 260 265 270
 Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro
 275 280 285
 Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
 290 295 300

<210> 445

<211> 304

<212> PRT

5 <213> Papio hamadryas

<400> 445

Met Ala Asp Tyr His Asn Asn Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Leu Glu Phe
 1 5 10 15
 Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys Val Leu His Ile Gln
 20 25 30

Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln
35 40 45
Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp
50 55 60
Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys
65 70 75 80
Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu
85 90 95
Tyr Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val
100 105 110
Glu Glu Ile Pro Trp Lys Arg Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val
115 120 125
His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu
130 135 140
Gln Leu Arg Ser Gly Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu
145 150 155 160
Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp
165 170 175
Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln
180 185 190
Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Glu
195 200 205
Ala Thr Trp Gly Thr Ile Arg Asp Leu Val Leu Glu Lys Phe Ala Gly
210 215 220
Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr
225 230 235 240
Asp Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met
245 250 255
Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys
260 265 270
Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro
275 280 285
Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
290 295 300

<210> 446

<211> 394

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (104)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

10 <220>

<221> MUTAGEN

<222> (277)

<223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<400> 446

Met Glu Lys Phe Ile Trp Tyr Leu Val His Leu Tyr Thr Glu Met Thr
1 5 10 15

Lys Ser Ser Pro Ser Cys Arg Leu Val Ala Ser Cys Gln Thr Val Ala
20 25 30

Lys Glu Leu Gly Glu Asn Ser Leu Gly Tyr Gly Pro Gly His Tyr Leu
35 40 45

Leu Phe Gly Cys Arg Asp Ala Phe Gly Cys Pro Met Pro Gly Leu Phe
50 55 60

His Leu Leu Gln Asp Gln Met Ile Gly Ser Leu His Thr Asp Ser Leu
65 70 75 80

Pro Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Glu Met
85 90 95

Val Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys
100 105 110

Glu Val Ala Thr Ser Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr
115 120 125

Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn
130 135 140

Thr Val His Val Leu Ala Lys Phe Lys Glu Asn Asp Pro Ala Asn Ile
145 150 155 160

Asp Gly Ala Met Glu Lys Ala Phe Cys Phe Phe Leu Gln Ile Lys Ser
165 170 175

Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser Phe
180 185 190

Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Met Glu Glu Ile Pro Trp Lys
195 200 205

His Leu Gly Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile His Thr
210 215 220

Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Leu Arg Ser Gly Pro
225 230 235 240

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

Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro
260 265 270

Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg
275 280 285

Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Lys Ala Thr Trp Asp Thr Ile
290 295 300

Arg Asp Leu Val Met Glu Lys Ser Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly Glu
305 310 315 320

Tyr Leu Thr Ser Val Gln Lys Thr Leu Cys Asp Ile Gln Val Leu Ser
325 330 335

Leu Ser Arg Val Pro Ala Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn
340 345 350

Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn Lys
355 360 365

Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr Gly
370 375 380

Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
385 390

<210> 447
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

5 <220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (30)
 <223> Codón natural de parada reemplazado por Arg

<400> 447
 Met Pro Val Phe Ser Leu Gln Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr
 1 5 10 15
 Gly Tyr Gly Lys Asp Ile Val Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly
 20 25 30
 Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln Leu Thr Leu
 35 40 45
 Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Ile Ile Pro
 50 55 60
 Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys Phe Lys Glu
 65 70 75 80
 Asn Glu Pro Ala Asn Ile Asp Gly Ala Met Glu Lys Ala Phe Cys Phe
 85 90 95
 Phe Leu Gln Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu
 100 105 110
 His Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val
 115 120 125
 Glu Glu Ile Pro Trp Lys His Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val
 130 135 140
 His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Gly Glu Val Glu
 145 150 155 160
 Gln Leu Arg Ser Gly Pro Gln Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu
 165 170 175
 Lys Leu Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp
 180 185 190
 Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Phe Lys Cys Met Met Arg Thr Leu
 195 200 205
 Pro Gln Ser Ser Phe Pro Leu Phe Gln Val Leu Ser Met Gly Ser Ser
 210 215 220
 Leu Met Asp Thr Ile Arg Asp Leu Val Met Glu Lys Ser Ala Gly Pro
 225 230 235 240
 Tyr Asp Lys Asp Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Cys Asp
 245 250 255
 Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Ala Ile Glu Asp Met Glu
 260 265 270
 Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met
 275 280 285
 Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr
 290 295 300
 Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
 305 310 315

<210> 448
 <211> 304

<212> PRT
<213> Papio hamadryas

<400> 448
Met Ala Asp Tyr His Asn Asn Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Leu Glu Phe
1 5 10 15
Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys Val Leu His Ile Gln
20 25 30
Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln
35 40 45
Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp
50 55 60
Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys
65 70 75 80
Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu
85 90 95
Tyr Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val
100 105 110
Glu Glu Ile Pro Trp Lys Arg Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val
115 120 125
His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu
130 135 140
Gln Leu Arg Ser Gly Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu
145 150 155 160
Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp
165 170 175
Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln
180 185 190
Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Glu
195 200 205
Ala Thr Trp Gly Thr Ile Arg Asp Leu Val Leu Glu Lys Phe Ala Gly
210 215 220
Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr
225 230 235 240
Asp Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met
245 250 255
Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys
260 265 270
Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro
275 280 285
Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
290 295 300

<210> 449
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 449
caccaaatgc tgcacagaat cct 23

<210> 450
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 450
 acctgaccta caggaaagag 20

 <210> 451
 <211> 23
 5 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 451
 caccaaatgc tgcacagaat cct 23

 <210> 452
 10 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 452
 acctgaccta caggaaagag 20

 15 <210> 453
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 453
 20 caccaaatgc tgcacagaat cct 23

 <210> 454
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 25 <400> 454
 acctgaccta caggaaagag 20

 <210> 455
 <211> 20
 <212> DNA
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 455
 catacaaact taagagtcca 20

 <210> 456
 <211> 67
 35 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 456
 ctttaaatcg atgagcaacc tcaactcttgt gtgcatctct cttatccaaa gaaccggaat 60
 aagccga 67

 <210> 457
 40 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 457
 catacaaact taagagtcca 20

 45 <210> 458
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 458
 50 ctttaaatcg atgagcaacc tcaactcttgt gtgcatctct cttatccaaa gaaccggaat 60
 aagccga 67

<210> 459
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5 <400> 459
 gttagcagag tagcagggct ttcggct 27

<210> 460
 <211> 95
 <212> DNA
 10 <213> Homo sapiens

<400> 460
 caagcaatga attccttagc agcttgacct tccaagtaag aagaaacatc agaagtgaag 60
 gtaccttcac cgtgtctctt atccaaagaa ccgga 95

<210> 461
 <211> 103
 15 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 461
 gagcgcaagc ttccgccatc atgaaggtct ccgtggctgc cctctcctgc ctcatgcttg 60
 ttactgccct tggatcccag gccagcccca agatgggtgca agg 103

<210> 462
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20 <400> 462
 agtcccatcg atgagcaacc tctctctgt gtgcatcatg ccgcctcagc actttgc 57

25 <210> 463
 <211> 103
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 463
 gagcgcaagc ttccgccatc atgtgggtgc gcctgtggtg gctgctgctg ctgctgctgc 60
 30 tgctgtggcc catgggtgtg gccagcccca agatgggtgca agg 103

<210> 464
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

35 <400> 464
 agtcccatcg atgagcaacc tctctctgt gtgcatcatg ccgcctcagc actttgc 57

<210> 465
 <211> 104
 <212> DNA
 40 <213> Homo sapiens

<400> 465
 tccccgggg ccgccaccat gaaggctctc gtggctgccc tctcctgcct catgcttggt 60
 actgcccttg gatcccagc ccacgggtgaa ggtactttca cttc 104

<210> 466
 <211> 49
 45 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 466
 cgattgatca ttattataag cctaaggcag ctgacttg agcaacaag 49

<210> 467

<211> 38
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 467
 5 aggagcgtcg acaaaagaag cccaagatg gtgcaagg 38
 <210> 468
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 468
 ttataagcct aaggcagctt gacttg 26
 <210> 469
 <211> 115
 <212> DNA
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 469
 gagcgcggat ccaagcttcc gccatcatgc gcccacctg ggcttgggtg ctgttcctgg 60
 tgctgctgct ggccctgtgg gcccccgccc gcggcagccc caagatggtg caagg 115
 <210> 470
 <211> 57
 20 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 470
 agtcccatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcatg ccgcctcagc actttgc 57
 <210> 471
 <211> 29
 <212> DNA
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 471
 gagcgcggat ccaagcttcc gccatcatg 29
 <210> 472
 <211> 26
 <212> DNA
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 472
 35 ctttaaactg atgagcaacc tcactc 26
 <210> 473
 <211> 109
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 473
 gagcgcggat ccaagcttcc gccatcatgt ggtggcgccct gtggtggctg ctgctgctgc 60
 tgctgctgct gtggcccatg gtgtgggcca gcccgaagat ggtgcaagg 109
 <210> 474
 <211> 38
 <212> DNA
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 474
 gtcgtcggta ccttataagc ctaaggcagc ttgacttg 38
 <210> 475
 <211> 80
 50 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

ES 2 567 634 T3

<400> 475
 gagcgcggat ccaagcttcc gccatcatgt ggtggcgccct gtggtggctg ctgctgctgc 60
 tgctgctgct gtggcccatg 80

<210> 476
 <211> 57
 5 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 476
 agtcccatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcatg ccgcctcagc actttgc 57

<210> 477
 10 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 477
 gagcgcggat ccaagcttcc gccatcatgt ggtggcgccct gtggtggctg ctgctgctgc 60
 tgctgctgct gtggcccatg 80

15 <210> 478
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 478
 20 agtcccatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcatg ccgcctcagc actttgc 57

<210> 479
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

25 <400> 479
 aagctgcctt aggtttaagc cccaagatgg tgcaagggtc tggctgcttt gggaggaaga 60
 tggaccggat cagtcctcc 80

<210> 480
 <211> 64
 <212> DNA
 30 <213> Homo sapiens

<400> 480
 gcaccgggcg cgccttaatg ccgcctcagc actttgcagc ccaggccact ggaggagctg 60
 atcc 64

<210> 481
 <211> 37
 35 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 481
 aggagcgtcg acaaaagaag cccaagatg gtgcaag 37

<210> 482
 40 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 482
 cgcgcatcga tgagcaacct cactcttgtg tgcatcatgc cgcctcagca ctttgc 56

45 <210> 483
 <211> 670
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 483

ES 2 567 634 T3

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

ES 2 567 634 T3

Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	195	200	205
Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	210	215	220
Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	225	230	235
Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	245	250	255
Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	260	265	270
Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	275	280	285
Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	290	295	300
Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	305	310	315
Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	325	330	335
Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	340	345	350
Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	355	360	365
Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	370	375	380
Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	385	390	395
Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	405	410	415
Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	420	425	430
Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	435	440	445
Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	450	455	460
Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	465	470	475
Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	485	490	495
Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	500	505	510

ES 2 567 634 T3

Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
515 520 525

Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
530 535 540

Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
545 550 555 560

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
565 570 575

Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
580 585 590

Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
595 600 605

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
610 615 620

Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
625 630 635 640

Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
645 650 655

Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
660 665 670

<210> 484

<211> 96

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 484

agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggagga agatggaccg gatcagctcc 60
tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat 96

<210> 485

<211> 32

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 485

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
1 5 10 15

Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
20 25 30

<210> 486

15 <211> 95

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 486

agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggagga agatggaccg gatcagctcc 60
20 tccagtggct gggctgCaaa gtgctgaggc ggcac 95

<210> 487

<211> 40

<212> DNA

25 <213> Homo sapiens

<400> 487

ccttgacca tcttgggct atgccgctc agcactttgc 40

<210> 488

<211> 40

ES 2 567 634 T3

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 488
gcaaagtgtct gaggcggcat agccccaaga tggcgcaagg 40

5 <210> 489
<211> 57
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10 <400> 489
agtcccatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcatg ccgcctcagc actttgc 57

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de albúmina que comprende dos o más polipéptidos de Péptido 1 de Tipo Glucagón (GLP-1) orientados en tándem, en donde dicha proteína de fusión de albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
 - 5 (a) la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387;
 - (b) una variante de (a) que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387, en donde dicha variante tiene actividad GLP-1; o
 - (c) un fragmento de (a) o (b) en donde dicho fragmento tiene actividad GLP-1;fusionada a:
 - 10 (i) una albúmina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1; o
 - (ii) una variante de albúmina cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1;en donde la proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia líder HSA/kex2 modificada del SEQ ID NO: 112.
2. La proteína de fusión de albúmina de la reivindicación 1, producida a partir de una célula anfitriona que comprende un constructo que expresa dicha proteína de fusión de albúmina, en donde dicho constructo es el ID de Constructo 3610.
3. La proteína de fusión de albúmina de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 387.
4. La proteína de fusión de albúmina de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 319.
5. La proteína de fusión de albúmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichos al menos dos polipéptidos GLP-1 orientados en tándem están fusionados en el extremo N o en el extremo C a dicha albúmina, fragmento de albúmina, o variante de albúmina de los mismos.
6. La proteína de fusión de albúmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha albúmina es albúmina humana.
7. La proteína de fusión de albúmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende el SEQ ID NO: 1.
8. La proteína de fusión de albúmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichos dos o más polipéptidos GLP-1 orientados en tándem están fusionados genéticamente a dicha albúmina, fragmento de albúmina, o variante de albúmina de los mismos.
9. Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de albúmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un vector que comprende un promotor asociado operablemente con el polinucleótido de la reivindicación 9.
11. Un vector de la reivindicación 10, en donde el promotor se selecciona entre:
 - (a) un promotor Met25;
 - 35 (b) un promotor cbh1; y
 - (c) un promotor cysD de *Aspergillus nidulans*.
12. Una célula anfitriona aislada que comprende un vector de la reivindicación 10 u 11.
13. La célula anfitriona aislada de la reivindicación 12, que es una célula de levadura o una célula de mamífero.
14. La célula anfitriona aislada de la reivindicación 13, en donde dicha célula anfitriona es una célula de levadura seleccionada entre *S. cerevisiae*, *K. lactis* o *P. Pastoris*.
15. La célula anfitriona aislada de la reivindicación 13 o 14, en donde dicha levadura presenta deficiencia en glicosilación.
16. La célula anfitriona aislada de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde dicha levadura presenta deficiencia en glicosilación y proteasa.

17. La célula anfitriona aislada de la reivindicación 13, en donde dicha célula de mamífero es una célula CHO, una célula COS, o una célula NS0.

18. Una composición que comprende la proteína de fusión de albúmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 19. Un método para producir una proteína de fusión de albúmina que comprende:

(a) transformar una célula anfitriona que comprende al menos un vector de la reivindicación 10 u 11;

(b) cultivar la célula anfitriona en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión de albúmina; y

(c) aislar la proteína de fusión de albúmina.

10 20. El método de la reivindicación 19, en donde la proteína de fusión de albúmina aislada experimenta un procesamiento adicional para eliminar la secuencia líder.

1 GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA AAT TTC AAA 60
 1 D A H K S E V A H R F K D L G E E N F K 20

 61 GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA 120
 21 A L V L I A F A Q Y L Q Q C P F E D H V 40

 121 AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA 180
 41 K L V N E V T E F A K T C V A D E S A E 60

 181 AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT 240
 61 N C D K S L H T L F G D K L C T V A T L 80

 241 CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA 300
 81 R E T Y G E M A D C C A K Q E P E R N E 100

 301 TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT 360
 101 C F L Q H K D D N P N L P R L V R P E V 120

 361 GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT 420
 121 D V M C T A F H D N E E T F L K K Y L Y 140

 421 GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG 480
 141 E I A R R H P Y F Y A P E L L F F A K R 160


 Figura 1A

481 TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA 540
 161 Y K A A F T E C C Q A A D K A A C L L P 180

541 AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT 600
 181 K L D E L R D E G K A S S A K Q R L K C 200

601 GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC 660
 201 A S L Q K F G E R A F K A W A V A R L S 220

661 CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA 720
 221 Q R F P K A E F A E V S K L V T D L T K 240

721 GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT 780
 241 V H T E C C H G D L L E C A D D R A D L 260

781 GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA 840
 261 A K Y I C E N Q D S I S S K L K E C C E 280

841 AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATC TCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT 900
 281 K P L L E K S H C I A E V E N D E M P A 300

901 GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT 960
 301 D L P S L A A D F V E S K D V C K N Y A 320


 Figura 1B

```

961 GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT 1020
321 E A K D V F L G M F L Y E Y A R R H P D 340

1021 TAC TCT GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC 1080
341 Y S V V L L L R L A K T Y E T T L E K C 360

1081 TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT 1140
361 C A A A D P H E C Y A K V F D E F K P L 380

1141 GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG 1200
381 V E E P Q N L I K Q N C E L F E Q L G E 400

1201 TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT 1260
401 Y K F Q N A L L V R Y T K K V P Q V S T 420

1261 CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT 1320
421 P T L V E V S R N L G K V G S K C C K H 440

1321 CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA 1380
441 P E A K R M P C A E D Y L S V V L N Q L 460

1381 TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG TCC 1440
461 C V L H E K T P V S D R V T X C C T E S 480

```

Figura 1C

```

1441 TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA 1500
481 L V N R R P C F S A L E V D E T Y V P K 500

1501 GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG 1560
501 E F N A E T F T F H A D I C T L S E K E 520

1561 AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA 1620
521 R Q I K K Q T A L V E L V K H K P K A T 540

1621 AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG 1680
541 K E Q L K A V M D D F A A F V E K C C K 560

1681 GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA 1740
561 A D D K E T C F A E E G K K L V A A S Q 580

1741 GCT GCC TTA GCC TTA TAA CAT CTA CAT TTA AAA GCA TCT CAG 1782
581 A A L G L * 585

```

Figura 1D

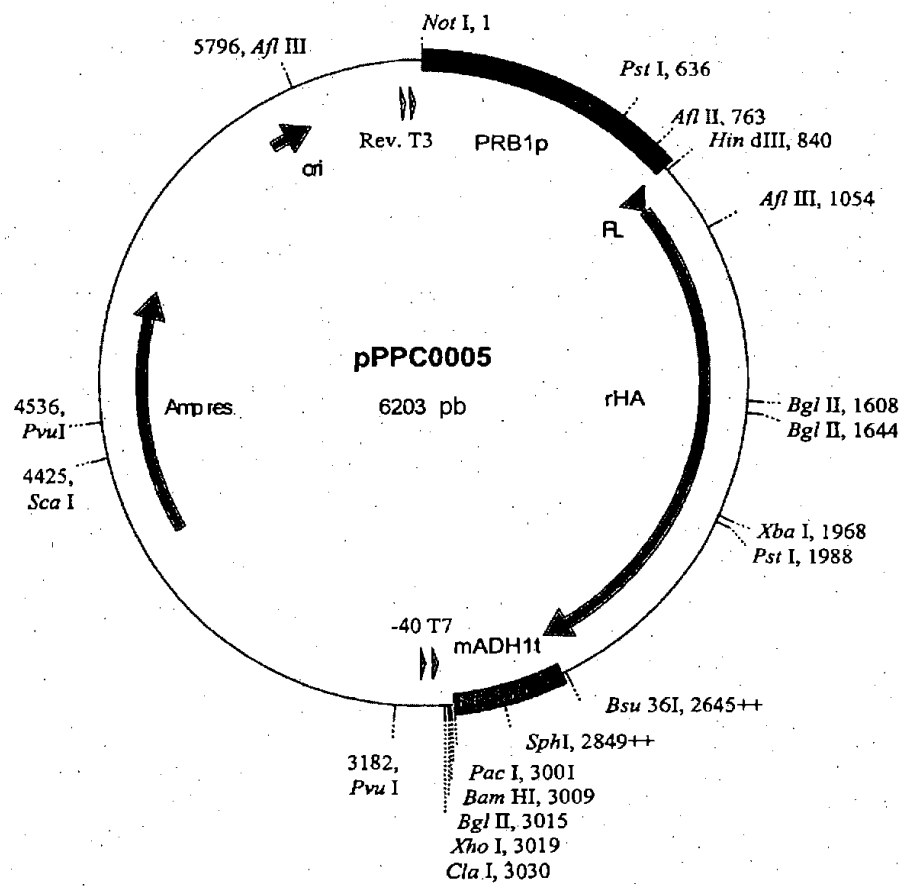


Figura 2

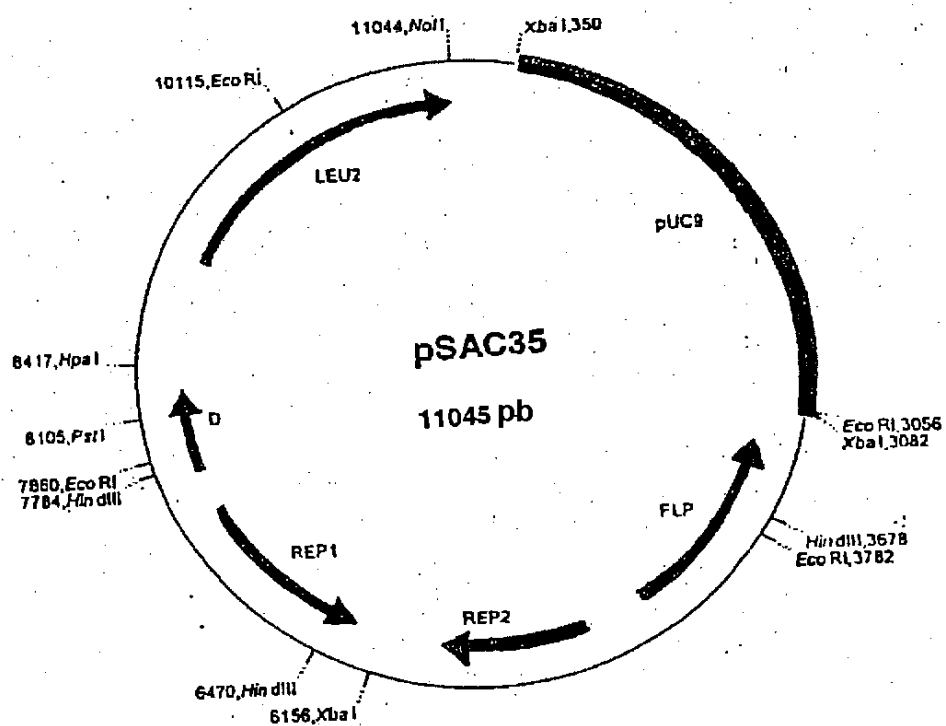


Figura 3

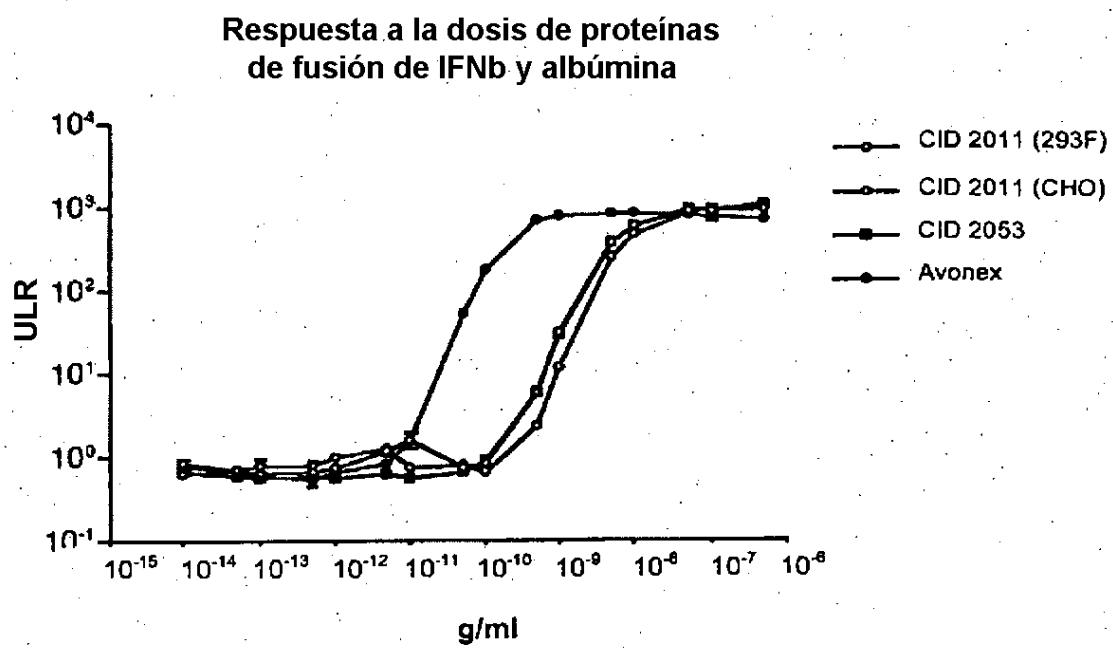


Figura 4

Inhibición de la proliferación de células de melanoma HS294T por proteína de fusión de IFN α y albúmina

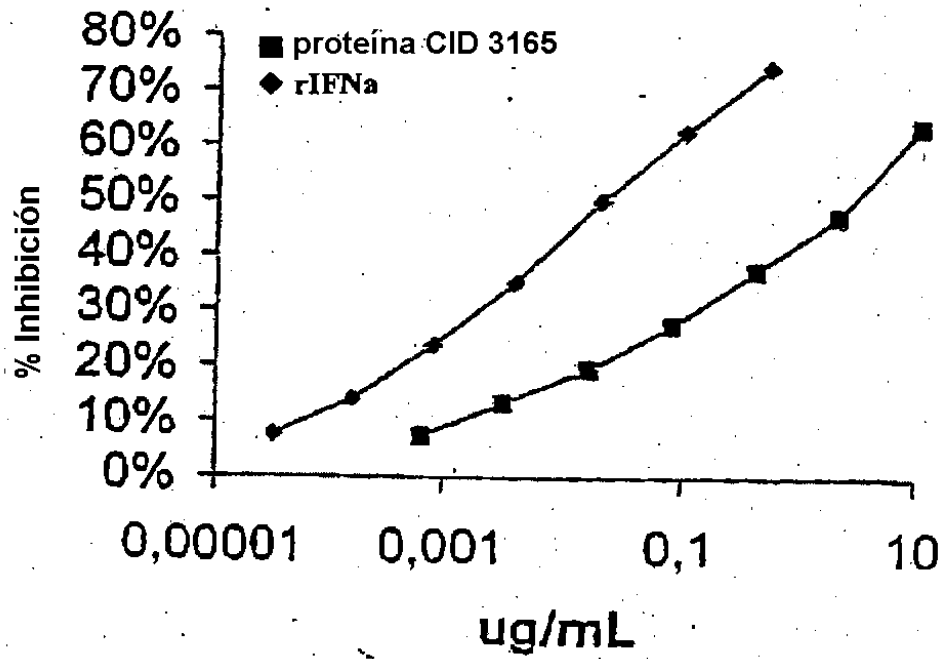


Figura 5

Activación SEAP con proteínas de fusión de IFN α y albúmina

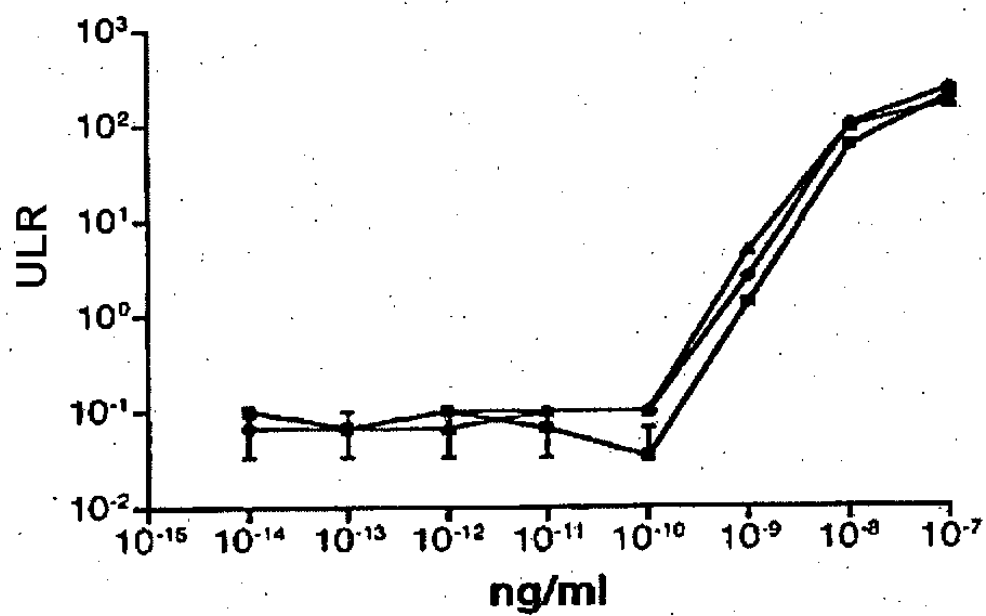


Figura 6

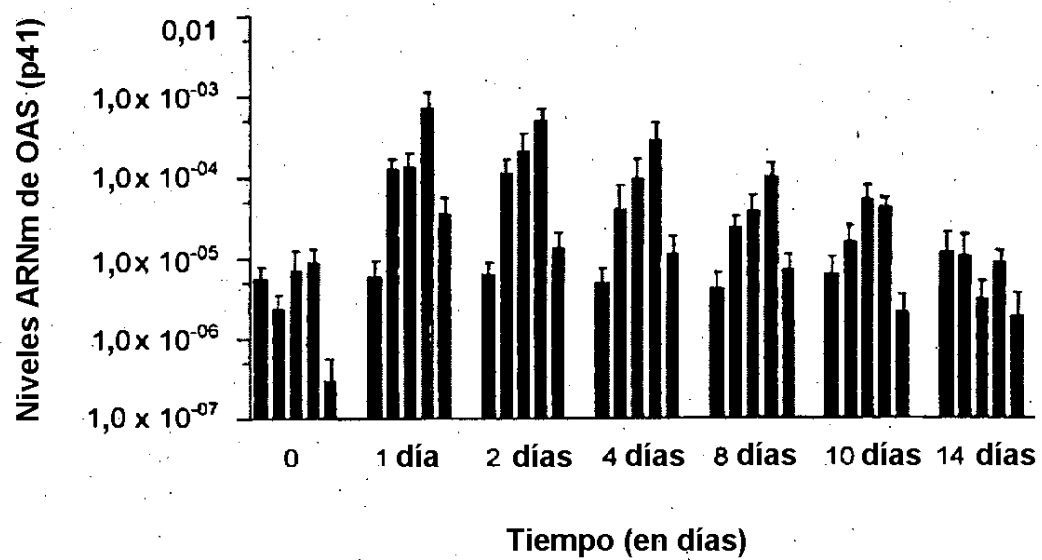


Figura 7

**Respuesta a la dosis de proteínas de fusión de
BNP recombinante y BNP y albúmina
BNP-HSA y BNP(2)-HSA**

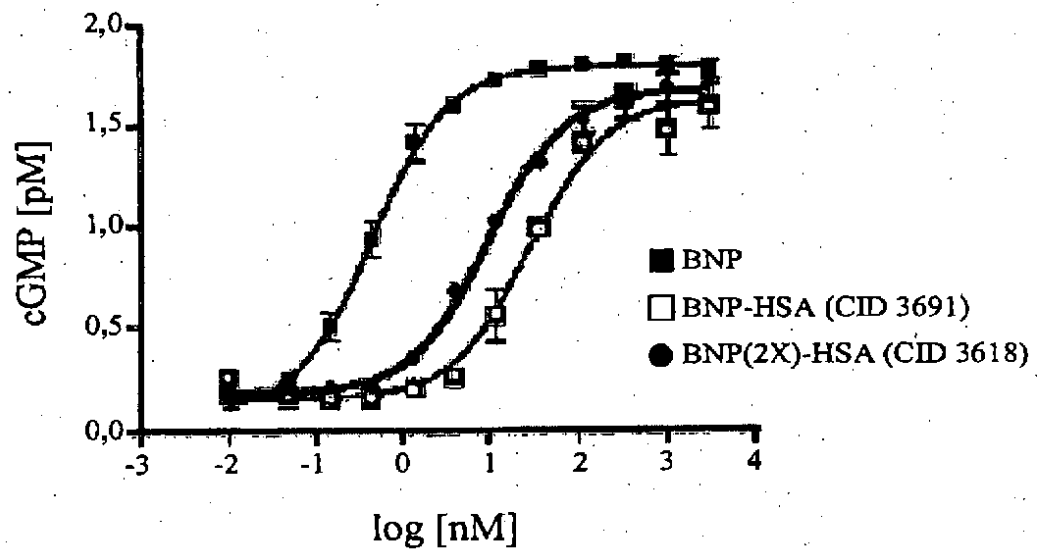


Figura 8

**Efecto de proteínas de fusión de BNP y albúmina
sobre la presión arterial media en
ratas espontáneamente hipertensas**

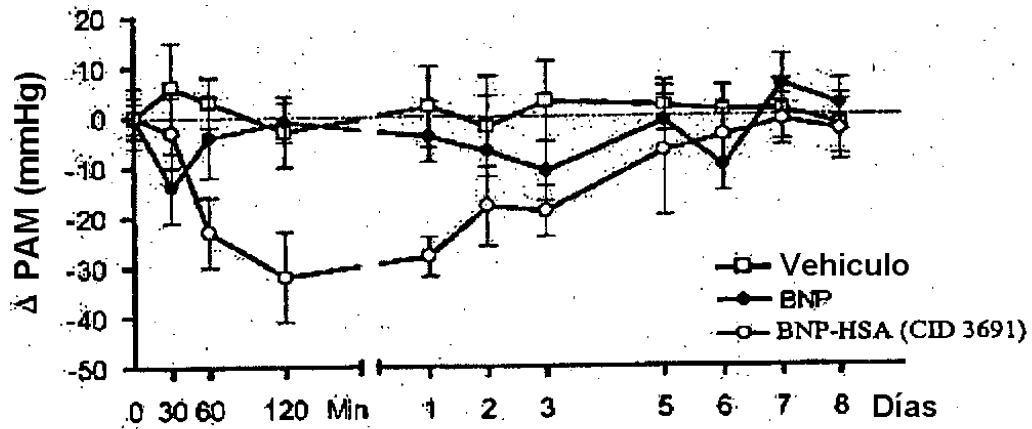


Figura 9

Niveles de cGMP in vivo en ratones después de una inyección intravenosa de proteínas de fusión de BNP recombinante o BNP y albúmina

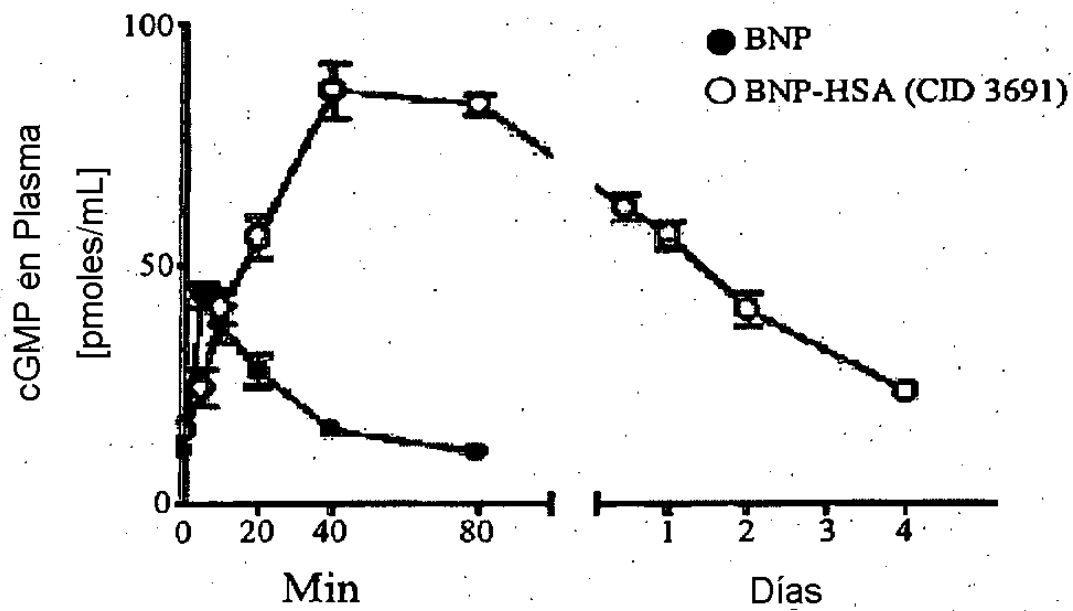


Figura 10

Efecto de fusiones de GLP-1-HSA sobre la glucosa en sangre de ratones db/db mantenidos en ayunas

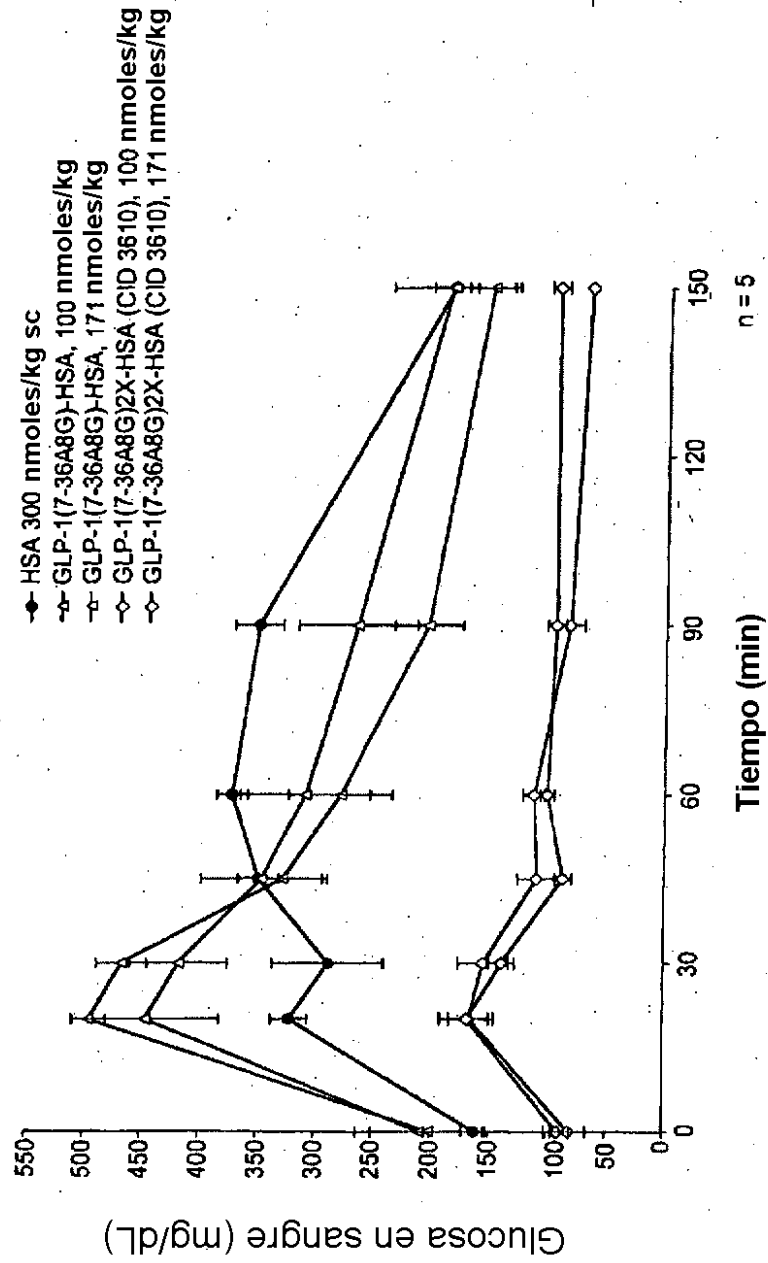


Figura 11