

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 487**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 9/52 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2008 E 14170744 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2781223**

54 Título: **Composiciones que comprenden semaforinas para uso en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

19.10.2007 US 960910 P

16.01.2008 US 6496 P

10.04.2008 US 71053 P

06.05.2008 US 71560 P

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

28.06.2017

73 Titular/es:

**RAPPAPORT FAMILY INSTITUTE FOR
RESEARCH IN THE MEDICAL SCIENCES
(100.0%)**

**Efron Street P.O.Box 9697
31096 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**NEUFELD, GERA;
KIGEL, BOAZ;
KESSLER, OFRA y
VARSHAVSKY, ASYA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 620 487 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

Composiciones que comprenden semaforinas para uso en el tratamiento del cáncer

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para tratar el cáncer.

5 Los receptores neuropilina 1 (np1) y neuropilina 2 (np2) fueron caracterizados originalmente como receptores
funcionales para factores orientadores de los axones que pertenecen a la familia de las semaforinas de clase 3
(sema3). Posteriormente se demostró que las neuropilinas se expresaban en las células endoteliales y en muchos
tipos de células cancerosas. También se encontró que las neuropilinas funcionan además como receptores para
10 varios factores angiogénicos que pertenecen a la familia del VEGF y como receptores del factor de crecimiento de
los hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SF), que es un factor de crecimiento inductor de angiogénesis/metástasis,
y que funcionan como potentes estimuladores de su actividad proangiogénica.

15 La mayoría de las sema3, con la excepción de la sema3E que se fija a PlexD1, se fijan a uno de los dos receptores
neuropilina o a ambos. Las neuropilinas forman complejos espontáneos con varios miembros de la familia de
receptores plexina. En estos complejos, las sema3 se fijan a las neuropilinas mientras que las plexinas funcionan
como elementos transductores de la señal. Las cuatro plexinas de tipo A (plexina A1 a plexina A4) así como la
plexina D1 forman complejos con las neuropilinas y participan en la transducción de señales mediada por las
neuropilinas.

20 Las semaforinas sema3B y sema3F también se caracterizaron por ser supresores tumorales cuya pérdida contribuye
al desarrollo del cáncer de pulmón [Tomizawa, Y., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 13954-13959; Xiang, R.,
2002. *Cancer Res.* 62: 2637-2643].

25 La identificación de las neuropilinas en las células endoteliales sugirió que las semaforinas de clase 3 pueden ser
capaces de regular la angiogénesis. De hecho, la semaforina de clase 3 sema3F, un agonista de np2, funciona
como repelente de las células endoteliales, induce la apoptosis de las células endoteliales tras una prolongada
estimulación [Bielenberg, D. R. et al., 2004, *J. Clin. Invest.* 114: 1260-1271; Guttman-Raviv, N. et al., 2007, *J. Biol.*
Chem., 282: 26294-26305] e inhibe la angiogénesis y la progresión tumoral *in vivo* [Bielenberg, D. R. et al., 2004, *J.*
Clin. Invest. 114: 1260-1271; Kessler, O. et al. 2004. *Cancer Res.* 64: 1008-1015]. También se demostró que la
sema3A, agonista de np1, inhibe la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* [Miao, H. Q., 1999, *J. Cell Biol.* 146: 233-242.
Bates, D., 2003, *Dev. Biol.* 255: 77-98; Acevedo, L. M., 2008. *Blood.* 111: 2674-2680]. También se demostró que la
sema3E era un repelente que inhibía la invasión de los vasos sanguíneos que expresan PlexD1 en los metámeros
30 durante el desarrollo embrionario [Gu, C. et al., 2005, *Science*, 307: 265-268].

En cambio, los datos existentes sugieren que la sema3C funciona como proneoplásico y proangiogénico [Herman, J.
G. et al., *Int. J. Oncol.* 2007; 30: 1231-1238; Banu, N., *FASEB J.* 2006; 20: 2150-2152].

35 El hecho de que las neuropilinas y las plexinas, tal como PlexD1, también se expresen en muchos tipos de células
tumorales indica que las semaforinas también pueden influir directamente en el comportamiento de las células
tumorales. De hecho, las sema3, tales como sema3F y sema3B, se ha observado que inhiben la adhesión,
migración o la proliferación de las células tumorales que expresan los receptores de semaforinas adecuados
[Tomizawa, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13954-13959; Xiang, R., 2002. *Cancer Res.* 62: 2637-2643;
Bielenberg, D. R. et al., 2004, *J. Clin. Invest.* 114: 1260-1271; Nassarre, 2006, *Neoplasia.* 7: 180-189]. Por el
contrario, no obstante, el producto de la escisión de Sema3E se demostró que inducía la invasión tumoral y la
40 metástasis tumoral [Christensen, C., 2005, *Cancer Res.* 65, 6167-6177].

Compendio de la invención

La presente invención proporciona una semaforina 3D que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95%
homóloga a la secuencia de SEQ ID NO: 29 para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

El cáncer que se va a tratar puede ser cáncer de mama, cáncer pancreático o cáncer de pulmón.

45 En una realización de la invención, la semaforina se administra sistemáticamente.

En otra realización, la semaforina se administra localmente.

En una realización, la semaforina está unida a un agente potenciador de liberación sostenida, tal como ácido
hialurónico (HA), ácido algínico (AA), metacrilato de polihidroxietilo (Poli-HEMA), polietilenglicol(PEG), glime o
poliisopropilacrilamida.

50 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y/o científicos usando en la presente memoria
tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por el experto en la materia al que pertenece la invención.
En caso de conflicto, prevalecerá la memoria de patente, incluyendo las definiciones.

Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos acompañantes. En este sentido, la descripción tomada con los dibujos deja muy claro a los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la invención.

5 En los dibujos:

Las figuras 1A-C son fotografías que ilustran la expresión de los receptores de las sema3 en las líneas celulares procedentes de cáncer de mama. Figura 1A. Las células se hacen crecer hasta una confluencia del 80% y se lisan. Se cargan cantidades iguales de proteínas, se separan en geles de SDS/PAGE y se transfieren a nitrocelulosa. Los análisis por transferencia Western de np1 y np2 se realizan tal y como está descrito. Figuras 1B-C. El análisis por PCR inversa de la expresión de plexA1-A4 y plexD1 se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit PerfectPure con las parejas de cebadores específicas para las diferentes plexinas.

10 Las figuras 2A-L son gráficos y fotografías que ilustran el efecto de la expresión de diferentes sema3 sobre el desarrollo de tumores a partir de las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se implantaron en la almohadilla de grasa de la mama de ratonas balb/c nu/nu según está descrito. Figuras 2A, D, G, J. Análisis por transferencia Western de alícuotas del medio acondicionado procedente de las células que expresan las diferentes sema3. Al final del experimento, se extirparon los tumores y se fotografiaron. Figuras 2B, E, H, K. El volumen medio de los tumores en desarrollo se midió según está descrito. Figuras 2C, F, I, L. La masa media de los tumores al final del experimento se determinó según está descrito.

15 Las figuras 3A-I son gráficos y fotografías que ilustran el efecto de la expresión de las diferentes sema3 sobre el desarrollo de tumores a partir de las células MDA-MB-435. Las células MDA-MB-435 se implantaron en la almohadilla de grasa de la mama de ratonas balb/c nu/nu según está descrito. Figuras 3A, D, G. Análisis por transferencia Western de alícuotas del medio acondicionado procedente de las células que expresan las diferentes sema3. Figuras 3B, E, H. El volumen medio de los tumores en desarrollo se midió según está descrito. Figuras 3C, F, I. La masa media de los tumores al final del experimento se determinó según está descrito.

20 Las figuras 4A-F son gráficos y fotografías que ilustran el efecto de la expresión de sema3A y sema3F sobre el desarrollo de tumores a partir de las células MCF-7 y MDA-MB-468. Las células MCF-7 y MDA-MB-468 se implantaron en la almohadilla de grasa de la mama de ratonas balb/c nu/nu según está descrito. Figuras 4A, D. Análisis por transferencia Western de alícuotas del medio acondicionado procedente de las células que expresan la sema3A o bien la sema3F. Figuras 4B, E. El volumen medio de los tumores en desarrollo se midió según está descrito. Figuras 4C, F. La masa media de los tumores al final del experimento se determinó según está descrito.

25 Las figuras 5A-E son gráficos y fotografías que ilustran que las diferentes sema3 repelen las células endoteliales *in vitro* y reducen la densidad de los vasos sanguíneos asociados a los tumores *in vivo*. Figura 5A. Las células HEK293 de control infectadas con un vector lentivírico vacío o las células HEK293 que expresan la sema3A, la sema3D o la sema3E fueron sembradas sobre una monocapa de células HUVEC según se describe en los procedimientos experimentales. Las células HEK293 se marcaron con un colorante vital fluorescente, Dlasp, antes de la inoculación. Se muestran fotos compuestas tomadas por microscopia fluorescente y de fase. Figura 5B. Las células HEK293 de control infectadas con un vector lentivírico vacío o las células HEK293 que expresan la sema3F, la sema3G fueron sembradas sobre una monocapa de células PAE que expresan np2 y plexA1 según se describe en Materiales y métodos. Las células HEK293 se tiñeron con Dlasp y se fotografiaron según se describe más arriba en la presente memoria. Figura 5C. La media del área de vasos sanguíneos por campo al microscopio se determinó en los cortes procedentes de tumores que se desarrollaron a partir de las células MDA-MB-231 de control o de células MDA-MB-231 que expresan las diferentes sema3 según se describe en la presente memoria. Ya que los tumores que se desarrollaron de las células que expresan la sema3A eran muy pequeños, no se pudo determinar la densidad de los vasos sanguíneos en ellos. Figura 5D. La media del área de los vasos sanguíneos por campo al microscopio se determinó en los tumores procedentes de células MCF-7 de control o de células MCF-7 que expresan la sema3A o la sema3F según está descrito más arriba en la presente memoria. Figura 5E. La media del área de los vasos sanguíneos por campo al microscopio se determinó en los tumores que se desarrollaron a partir de las células MDA-MB-435 de control o de las células MDA-MB-435 que expresan diferentes sema3 según está descrito más arriba en la presente memoria. No se desarrollaron tumores a partir de las células que expresaban la sema3G.

30 Las figuras 6A-D son gráficos y fotografías que ilustran que las diferentes sema3 inhiben la formación de colonias en agar blando a partir de las células MDA-MB-231 o MDA-MB-435. Figura 6A. Las suspensiones unicelulares de células MDA-MB-231 de control o de células MDA-MB-231 que expresan diferentes sema3 se inocularon en agar blando según se describe en la presente memoria. Se dejó que se formaran colonias durante 21 días. A continuación, las colonias se tiñeron con violeta de genciana y se fotografiaron los campos al microscopio. El número medio/campo de colonias con una diámetro de más de 150 μm se determinó entonces según está descrito en los procedimientos experimentales. Figura 6B. Fotografías de campos representativos al microscopio que contienen colonias teñidas con violeta de genciana que se desarrollaron en agar blando a partir de las células MDA-MB-231 de control o de las células MDA-MB-231 que expresan las sema3. Figura 6C. La formación de colonias en agar blando a partir de las células MDA-MB-435 o de las células MDA-MB-435 que expresan diferentes sema3 se

determinó según está descrito más arriba en la presente memoria. Figura 6D. Fotografías de campos representativos al microscopio que contienen colonias teñidas con violeta de genciana que se desarrollaron en agar blando a partir de las células MDA-MB-435 de control o de las células MDA-MB-435 que expresan las sema3.

5 Las figuras 7A-D son gráficos y fotografías que ilustran que la expresión de np1 en las células MDA-MB-435 estimula el crecimiento de los tumores resultantes y que la sema3A anula el efecto estimulante. Figura 7A. En la parte superior se muestra un análisis por transferencia Western que compara la expresión de np1 en las células MDA-MB-435 infectadas con diferentes combinaciones que son un vector lentivírico de control, un vector lentivírico que contiene el ADNc de np1 y un vector lentivírico que contiene el ADNc de sema3A. El volumen tumoral medio se midió durante el experimento según está descrito y se muestra en la parte inferior del gráfico. Figura 7B. Fotografías de tumores extirpados al final del experimento. Figura 7C. Se determinó la masa media de los tumores al final del experimento. Figura 7D. Se determinó la media del área de los vasos sanguíneos/campo en los cortes de tumores.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

15 La presente invención hace referencia a composiciones de semaforina, para tratar enfermedades asociadas a la angiogénesis tales como el cáncer. Específicamente, la presente invención proporciona una semaforina 3D que tiene una secuencia de aminoácidos al menos homóloga en un 95% a la secuencia de SEQ ID NO: 29 para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

20 Las semaforinas que pertenecen a la subfamilia de las semaforinas de clase 3 (sema3) funcionan como factores orientadores de axones durante el desarrollo embrionario. La mayoría de las semaforinas de clase 3, con la excepción de la sema3E, se fijan a uno de los dos receptores neuropilina, que a su vez forman complejos con varios miembros de la familia de receptores plexina. En estos complejos, las neuropilinas se fijan a las semaforinas, mientras las plexinas funcionan como los elementos transductores de la señal.

Las semaforinas sema3B y sema3F se han caracterizado como supresores tumorales, mientras que a las sema3F, sema3A y sema3E se les ha atribuido una función antiangiogénica.

25 Los presentes inventores han demostrado que sema3A, sema3D, sema3E y sema3G funcionan cada una como potentes antineoplásicos (figuras 2A-L; figuras 3A-I; figuras 4A-F). Específicamente, la inyección de células de cáncer de mama que expresan estas semaforinas en ratonas atímicas dio lugar a tumores más pequeños que los tumores que se deben a la inyección de células tumorales que no expresan estas semaforinas.

30 Los presentes inventores también han demostrado que la inhibición, inducida por semaforinas, del desarrollo tumoral de tipos específicos de células de cáncer de mama está correlacionada con la expresión de los receptores de semaforinas adecuados en las células tumorales. Aunque la mayoría de las semaforinas analizadas también inhibieron la angiogénesis tumoral, los presentes inventores demostraron que no había ninguna correlación entre la inhibición de la angiogénesis tumoral y la inhibición del desarrollo tumoral. Estos resultados sugieren que la inhibición del desarrollo tumoral debida a las semaforinas depende de la expresión de los receptores de semaforinas adecuados en las células tumorales, y sugiere que la inhibición de la angiogénesis tiene menos importancia. 35 También sugieren que los tumores que contienen células tumorales que expresan receptores de semaforinas se prestan a la inhibición mediante las sema3 adecuadas y abren el camino para procedimientos mejores de medicina personalizada para el tratamiento del cáncer.

40 En la presente memoria se describe un procedimiento para seleccionar una semaforina para tratar el cáncer en un sujeto. El procedimiento descrito comprende la determinación de la expresión de un receptor de semaforinas en las células tumorales de una muestra de tumor del sujeto, en donde la cantidad de cada receptor de semaforinas indica qué semaforina es la adecuada para tratar el cáncer del sujeto.

45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «semaforina» hace referencia a un polipéptido de mamífero (p. ej., humano) que pertenece a la familia de las semaforinas (que incluye las semaforinas de las clases 3, 4, 5, 6 y 7). Las semaforinas funcionan típicamente como señales durante la orientación de los axones y comprenden un dominio sema.

50 Las semaforinas de la subfamilia de clase 3 de semaforinas incluyen semaforina 3A (número de acceso de GenBank NM_006080, SEQ ID n.º 26); la semaforina 3B (número de acceso de GenBank NM_001005914, SEQ ID n.º 27); la semaforina 3C (número de acceso de GenBank NM_006379, SEQ ID n.º 28); la semaforina 3D (número de acceso de GenBank NM_152754, SEQ ID n.º 29); la semaforina 3E (número de acceso de GenBank NM_012431, SEQ ID n.º 30); la semaforina 3F (número de acceso de GenBank NM_004186, SEQ ID n.º 31); o la semaforina 3G (número de acceso de GenBank NM_020163, SEQ ID n.º 32).

Una semaforina para uso en la presente invención es una semaforina 3D de SEQ ID NO: 29, o una homóloga que es el menos 95% homóloga a ella según se determina con el programa informático BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) con los parámetros por defecto).

55 La terminología «tratar» y «tratamiento», tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye anular, inhibir sustancialmente, enlentecer o revertir la progresión del cáncer, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o

estéticos del cáncer, o prevenir sustancialmente la aparición de los síntomas clínicos o estéticos del cáncer.

Típicamente, el sujeto para quien se selecciona la semaforina es un sujeto mamífero, p. ej., un humano.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «cáncer» hace referencia a la presencia de células que poseen características típicas de las células que ocasionan el cáncer, por ejemplo, proliferación incontrolada, pérdida de las funciones especializadas, inmortalidad, potencial metastásico significativo, incremento significativo de la actividad antiapoptótica, crecimiento y velocidad de proliferación rápidos, y determinadas características morfológicas y ciertos marcadores celulares. Típicamente, las células cancerosas están formando un tumor, que existe localmente dentro de un animal, o que circula por el torrente circulatorio como células independientes, por ejemplo, células leucémicas.

Ejemplos específicos del cáncer para los cuales se pueden seleccionar las semaforinas, como se describen en la presente memoria, incluyen, pero sin limitarse a ellos, carcinoma corticosuprarrenal hereditario; cáncer de vejiga; cáncer de mama; cáncer de mama canalicular; cáncer de mama intracanalicular invasivo; cáncer de mama esporádico; propensión al cáncer de mama; cáncer de mama de tipo 4; cáncer de mama de tipo 4; cáncer de mama de tipo 1; cáncer de mama de tipo 3; cáncer de mama y ovario; linfoma de Burkitt; carcinoma de cuello de útero; adenoma colorrectal; cáncer colorrectal; cáncer colorrectal sin poliposis hereditario de tipo 1; cáncer colorrectal sin poliposis hereditario de tipo 2; cáncer colorrectal sin poliposis hereditario de tipo 3; cáncer colorrectal sin poliposis hereditario de tipo 6; cáncer colorrectal sin poliposis hereditario de tipo 7; dermatofibrosarcoma protuberante; carcinoma de endometrio; cáncer de esófago; cáncer de estómago, fibrosarcoma, glioblastoma multiforme; tumores glómicos múltiples; hepatoblastoma; cáncer hepatocelular; carcinoma hepatocelular; leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; leucemia mieloide aguda con eosinofilia; leucemia no linfocítica aguda; leucemia mieloide crónica; síndrome del Li-Fraumeni; liposarcoma, cáncer de pulmón; cáncer de pulmón microcítico; linfoma no de Hodgkin; síndrome II familiar de cáncer de Linch; tumor de las células reproductoras masculinas; leucemia mastocítica; tiroideo medular; meduloblastoma; melanoma; meningioma; neoplasia endocrina múltiple; predisposición a la neoplasia maligna mieloide; mixosarcoma, neuroblastoma; osteosarcoma; cáncer de ovario; cáncer de ovario seroso; carcinoma de ovario; tumores de los cordones sexuales ováricos; cáncer de páncreas; tumores endocrinos pancreáticos; quimiodectoma familiar; pilomatricoma; tumor hipofisario invasivo; adenocarcinoma de próstata; cáncer de próstata; carcinoma renal papilar, familiar y esporádico; retinoblastoma; síndrome de predisposición rabdoide familiar; tumores rabdoideos; rhabdomyosarcoma; cáncer de pulmón microcítico; sarcoma de las partes blandas, carcinoma escamoso de cabeza y cuello; leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T; síndrome de Turcot con glioblastoma; tilosis con cáncer de esófago; carcinoma de cuello de útero; tumor de Wilms de tipo 2; y tumor de Wilms de tipo 1, y similares.

Tal y como se menciona, el procedimiento descrito de selección se lleva a cabo mediante la determinación de la expresión de un receptor de semaforinas en las células tumorales de una muestra de tumor de un sujeto.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «receptor de semaforinas» hace referencia a un polipéptido de la superficie celular que es capaz de fijarse a una semaforina y transducir una respuesta. Los ejemplos de receptores de semaforinas incluyen neuropilinas, plexinas e integras.

Así pues, por ejemplo, el receptor neuropilina puede ser un receptor neuropilina 1 (NP1; p. ej., NM_001024628; SEQ ID n.º 17) o un receptor neuropilina 2 (NP2; p. ej., NM_201279; SEQ ID n.º 18).

El receptor plexina puede ser un receptor plexinA1 (PlexA1; p. ej., NM_032242; SEQ ID n.º 19), un receptor plexinA2 (PlexA2, p. ej., NM_025179, SEQ ID n.º 20), un receptor plexinA3 (PlexA3; p. ej., NM_017514, SEQ ID n.º 21), un receptor plexinA4 (PlexA4, p. ej., NM_020911, SEQ ID n.º 22; NM_001105543, SEQ ID n.º 23; NM_181775, SEQ ID n.º 24) o un receptor plexinD (PlexD, p. ej., N_015103, SEQ ID n.º 25).

Se conocen en la técnica los procedimientos para determinar la expresión de un receptor de semaforinas. Específicamente, la determinación de la expresión de los receptores de semaforinas se puede efectuar por la cantidad de ARN o por la cantidad de proteína, como se detalla a continuación.

Procedimientos para detectar la expresión de un receptor de semaforinas por la cantidad de ARN

Análisis por transferencia Northern: este procedimiento implica la detección de un ARN concreto, a saber, un ARN de receptor de semaforinas en una mezcla de ARN. Se desnaturaliza una muestra de ARN mediante el tratamiento con un agente (p. ej., formaldehído) que impide la formación de puentes de hidrógeno entre las pares de bases, lo que asegura que todas las moléculas de ARN tienen una conformación lineal desplegada. A continuación, cada una de las moléculas de ARN se separa de acuerdo con el tamaño por electroforesis en gel y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de nilón a la cual se adhieren los ARN desnaturalizados. La membrana se expone entonces a las sondas de ADN marcadas. Las sondas se pueden marcar con radioisótopos o nucleótidos unidos a enzimas. Para la detección se puede utilizar la autorradiografía, la reacción colorimétrica o la quimioluminiscencia. Este procedimiento permite tanto cuantificar una cantidad de moléculas de ARN concretas como determinar su identidad mediante la posición relativa sobre la membrana, que es indicativa de la distancia que migró en el gel durante la electroforesis.

Análisis por RT-PCR: este procedimiento utiliza la amplificación por PCR de moléculas de ARN relativamente raras. Primero, las moléculas de ARN se purifican de las células y se convierten en ADN complementario (ADNc) con una enzima de tipo transcriptasa inversa (tal como la RT del MMLV) y cebadores tales como oligo-dT, hexámeros aleatorios o cebadores específicos de gen. A continuación, con la aplicación de cebadores específicos de gen y la ADN polimerasa Taq, se lleva a cabo una reacción de amplificación por PCR en un termociclador. Los expertos en la técnica son capaces de seleccionar la longitud y la secuencia de los cebadores específicos de gen y las condiciones de la PCR (a saber, temperaturas de hibridación, número de ciclos y similares) que son adecuados para detectar moléculas de ARN específicas. Se apreciará que se puede emplear una reacción de RT-PCR semicuantitativa mediante el ajuste del número de ciclos de PCR y la comparación del producto de amplificación con controles conocidos. Los cebadores de ejemplo que se pueden utilizar para detectar los receptores NRP1 se presentan en las SEQ ID n.º 3 y 4. Los cebadores de ejemplo que se pueden utilizar para detectar los receptores NRP2 se presentan en las SEQ ID n.º 5 y 6. Los cebadores de ejemplo que se pueden utilizar para detectar los receptores PLXNA1 se presentan en las SEQ ID n.º 7 y 8. Los cebadores de ejemplo que se pueden utilizar para detectar los receptores PLXNA2 se presentan en las SEQ ID n.º 9 y 10. Los cebadores de ejemplo que se pueden utilizar para detectar los receptores PLXNA3 se presentan en las SEQ ID n.º 11 y 12. Los cebadores de ejemplo que se pueden utilizar para detectar los receptores PLXNA4 se presentan en las SEQ ID n.º 13 y 14. Los cebadores de ejemplo que se pueden utilizar para detectar los receptores PLXND1 se presentan en las SEQ ID n.º 15 y 16. Los cebadores de ejemplo que se pueden utilizar para detectar los receptores CDH2 se presentan en las SEQ ID n.º 1 y 2.

Tinción del ARN por hibridación *in situ*: en este procedimiento, las sondas de ADN o ARN se unen a las moléculas de ARN presentes en las células. Por lo general, las células primero se fijan a cortes para microscopia para preservar la estructura celular y para impedir que las moléculas de ARN se degraden, y a continuación se someten a un tampón de hibridación que contiene la sonda marcada. El tampón de hibridación incluye reactivos, tales como la formamida y sales (p. ej., cloruro de sodio y citrato de sodio), que permiten la hibridación específica *in situ* de las sondas de ADN o ARN a sus moléculas diana de ARNm a la vez que se impide la fijación inespecífica de la sonda. Los expertos en la técnica son capaces de ajustar las condiciones de hibridación (a saber, temperatura, concentración de sales y formamida, y similares) para cada sonda y tipo de células. Tras la hibridación, toda sonda sin fijar se elimina por lavado y el portaobjetos se somete a la emulsión fotográfica que revela las señales generadas por las sondas radiomarcadas, o bien a una reacción colorimétrica que revela las señales generadas por las sondas marcadas por unión a enzima.

Tinción por RT-PCR *in situ*: este procedimiento lo describen Nuovo, G. J. et al. [«Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA». *Am. J. Surg. Pathol.* 1993, 17: 683-90] y Komminoth, P. et al. [«Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* RT-PCR». *Pathol. Res. Pract.* 1994, 190: 1017-25]. Brevemente, la reacción de RT-PCR se realiza en las células fijadas mediante la incorporación de nucleótidos marcados a la reacción de PCR. La reacción se lleva a cabo con un termociclador para *in situ* tal como el sistema PixCell I LCM de microdissección de captura con láser disponible de Arcturus Engineering (Mountainview, CA).

Micromatriz oligonucleotídica: en este procedimiento, las sondas oligonucleotídicas capaces de hibridarse específicamente a los polinucleótidos que codifican los receptores de semaforinas se fijan a una superficie sólida (p. ej., un portaobjetos de vidrio). Cada sonda oligonucleotídica tiene una longitud de aproximadamente 20-25 nucleótidos. Para detectar el perfil de expresión de los polinucleótidos en una determinada muestra de células (p. ej., células tumorales), se extrae el ARN de la muestra de células con los procedimientos conocidos en la técnica (con, p. ej., una solución de TRIZOL, Gibco BRL, EE.UU.). La hibridación puede tener lugar con sondas oligonucleotídicas marcadas (p. ej., sondas biotiniladas en 5') o fragmentos de ADN o de ARN complementarios (ADNc o ARNc, respectivamente) marcados. Brevemente, el ADNc bicatenario se prepara a partir del ARN mediante la transcriptasa inversa (RT) (p. ej., RT Superscript II), ADN ligasa y ADN polimerasa I, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies, Frederick, MD, EE.UU.). Para preparar el ARNc marcado, el ADNc bicatenario se somete a una reacción de transcripción *in vitro* en presencia de nucleótidos biotinilados con, p. ej., el kit de marcación de transcritos de ARN de gran rendimiento BioArray (Enzo, Diagnostics, Affymetrix Santa Clara CA). Para la hibridación eficaz, el ARNc marcado se puede fragmentar mediante la incubación del ARN en 40 mM de Tris/acetato (pH 8,1), 100 mM de acetato de potasio y 30 mM de acetato de magnesio durante 35 minutos a 94 °C. Tras la hibridación, se lava la micromatriz, y la señal de hibridación se barre con un escáner de fluorescencia de láser confocal que mide la intensidad de la fluorescencia emitida por el ARNc marcado unido a la matriz de sondas.

Por ejemplo, en la micromatriz de Affymetrix (Affymetrix®, Santa Clara, CA), cada gen de la matriz está representado por una serie de sondas oligonucleotídicas diferentes, de las cuales, cada pareja de sondas consiste en un oligonucleótido de concordancia perfecta y un oligonucleótido con discordancia. Mientras la sonda de concordancia perfecta tiene una secuencia exactamente complementaria al gen concreto, lo que permite así medir el nivel de expresión del gen concreto, la sonda con discordancia difiere de la sonda de concordancia perfecta por la sustitución de una única base en la posición de la base que está en el centro. La señal de hibridación se barre con el escáner de Agilent, y el programa informático Microarray Suite sustrae la señal inespecífica que se obtiene de la sonda con discordancia, de la señal que se obtiene de la sonda de concordancia perfecta.

Procedimientos para detectar los receptores de semaforinas por la cantidad de proteína

La determinación de la expresión de un receptor de semaforinas por la cantidad de proteína se lleva a cabo típicamente con un anticuerpo capaz de fijarse específicamente a un receptor de semaforinas concreto.

5 Los anticuerpos de ejemplo capaces de interactuar específicamente con NP1 y NP2 están ampliamente disponibles, p. ej., de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, n.º de catálogo sc-12122, sc-12123, sc-12125, sc-12128 y sc-50408).

10 Los anticuerpos de ejemplo capaces de interactuar específicamente con los receptores plexina están también disponibles ampliamente, p. ej., de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, n.º de catálogo sc-25639, sc-10138, sc-10139, sc-10144, sc-25640, sc-10143, sc-25641, sc-10135, sc-10134, sc-28372, sc-10147, sc-25642, sc-10145, sc-67034, sc-34504, sc-34506, sc-34507, sc-46240, sc-67144, sc-46241, sc-46242, sc-46243, sc-10152, sc-10149, sc-46244, sc-46245, sc-67145, sc-46246 y sc-46247). Los anticuerpos también están disponibles de Abcam MA, EE.UU. (n.º de catálogo ab32960, ab23391, ab39350, ab39357, ab39008, ab41564 y ab39715).

Preferiblemente, el anticuerpo se fija específicamente a al menos un epítipo del receptor de semaforinas. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «epítipo» hace referencia a cualquier determinante antigénico de un antígeno al cual se fija el parátipo de un anticuerpo.

15 Los determinantes epitópicos suelen consistir en agrupamientos de moléculas químicamente activos en la superficie, tales como cadenas laterales de aminoácidos o glúcidos, y suelen tener unas características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

20 La terminología «anticuerpo», tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv, que son capaces de fijarse a los macrófagos. Estos fragmentos funcionales de anticuerpo se definen como sigue: (1) Fab es el fragmento que contiene un fragmento monovalente de fijación al antígeno de una molécula de anticuerpo, que se puede producir mediante la digestión del anticuerpo entero con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener al tratar el anticuerpo entero con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos de Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂ es el fragmento del anticuerpo que se puede obtener al tratar el anticuerpo entero con la enzima pepsina sin la posterior reducción; el F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos mediante dos puentes disulfuro; (4) Fv se define como un fragmento manipulado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y (5) anticuerpo monocatenario («SCA» por su nombre en inglés) es una molécula manipulada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un conector polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria genéticamente fusionada.

35 Se conocen bien en la técnica los procedimientos para producir anticuerpos monoclonales y policlonales, así como los fragmentos de los mismos, que se fijan a los distintos receptores de semaforinas (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

Los procedimientos para detectar receptores de semaforinas incluyen inmunoensayos que incluyen, pero sin limitarse a ellos, sistemas de ensayo competitivos y acompetitivos que utilizan técnicas tales como transferencia de tipo Western, ELISA (inmunoensayo enzimático), inmunoensayo en «sandwich» y ensayos de inmunoprecipitación y ensayos inmunohistoquímicos, según se detalla más adelante en la presente memoria .

40 Inmunoensayo enzimático (ELISA): este procedimiento implica la fijación de una muestra (p. ej., células fijadas o una solución proteínica) que contiene un sustrato proteico unido a una superficie, tal como un pocillo de una placa de microtitulación. Se aplica un anticuerpo específico del sustrato conjugado a una enzima y se deja fijarse al sustrato. A continuación, se detecta la presencia del anticuerpo y se cuantifica mediante reacción colorimétrica con la enzima conjugada al anticuerpo. Las enzimas que se suelen emplear en este procedimiento incluyen la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina. Si se calibra bien y se encuentra dentro del intervalo lineal de respuesta, la cantidad de sustrato presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producido. Se suele emplear un sustrato estándar para mejorar la exactitud de la cuantificación.

50 Transferencia de tipo Western: este procedimiento implica separar un sustrato a partir de otra proteína por medio de un gel de acrilamida y luego transferir el sustrato a una membrana (p. ej., nilón o PVDF). A continuación, la presencia del sustrato se detecta con anticuerpos específicos contra el sustrato, que a su vez se detectan mediante reactivos que se fijan al anticuerpo. Los reactivos que se fijan al anticuerpo pueden ser, por ejemplo, proteína A u otros anticuerpos. Los reactivos que se fijan al anticuerpo pueden estar radiomarcados o conjugados a una enzima como se describe más arriba en la presente memoria. La detección puede ser mediante autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este procedimiento permite cuantificar una cantidad de sustrato y determinar su identidad por la posición relativa sobre la membrana que indica la distancia de migración en el gel de acrilamida durante la electroforesis.

55 Radioinmunoensayo (RIA): en una versión, este procedimiento implica la precipitación de la proteína deseada (a saber, el sustrato) con un anticuerpo específico y la proteína que se fija al anticuerpo radiomarcada (p. ej., proteína

A marcada con I¹²⁵) inmovilizada sobre un vehículo que se puede precipitar, tal como perlas de agarosa. El número de cuentas del sedimento precipitado es proporcional a la cantidad de sustrato.

5 En una versión alternativa del RIA, se emplean un sustrato marcado y una proteína de fijación al anticuerpo sin marcar. En distintas cantidades se le añade una muestra que contiene una cantidad desconocida de sustrato. La disminución en las cuentas precipitadas del sustrato marcado es proporcional a la cantidad de sustrato en la muestra añadida.

10 Clasificación de células activadas mediante fluorescencia (FACS, por su nombre en inglés): este procedimiento implica la detección *in situ* de un sustrato en las células mediante anticuerpos específicos contra el sustrato. Los anticuerpos específicos contra el sustrato están conjugados a fluoróforos. La detección es por medio de un equipo de clasificación de células que lee la longitud de onda de luz emitida de cada célula cuando pasa por un haz de luz. Este procedimiento puede emplear dos o más anticuerpos a la vez.

15 Análisis inmunohistoquímico: este procedimiento implica la detección *in situ* de un sustrato en las células fijadas mediante anticuerpos específicos contra el sustrato. Los anticuerpos específicos contra el sustrato pueden estar conjugados a enzimas o conjugados a fluoróforos. La detección es mediante microscopía y evaluación automática o subjetiva. Si se emplean anticuerpos conjugados a enzimas, podría necesitarse una reacción colorimétrica. Se apreciará que a la inmunohistoquímica le sigue a menudo la tinción complementaria de los núcleos celulares con, por ejemplo, tinción con hematoxilina o de Giemsa.

20 Ensayo de actividad *in situ*: de acuerdo con este procedimiento, se aplica un sustrato cromógeno sobre las células que contienen una enzima activa y la enzima catalizará una reacción en la cual el sustrato se descompone para producir un producto cromógeno visible al microscopio óptico o fluorescente.

Se apreciará que las células tumorales del sujeto se obtienen de una muestra tumoral, p. ej., durante una biopsia tumoral.

Tal y como se menciona, la cantidad de receptor de semaforinas indica qué semaforina es idónea para el tratamiento del cáncer del sujeto.

25 Se apreciará que la cantidad de receptor de semaforinas debe ser suficiente para transducir una respuesta biológica (a saber, inhibición tumoral). La cantidad de receptor que es suficiente para generar tal respuesta es típicamente dependiente de la afinidad de la semaforina por dicho receptor. Así pues, por ejemplo, si una semaforina tiene una afinidad alta por un receptor (p. ej., comprende una Km de aproximadamente 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M o incluso 10^{-11} M), la cantidad de receptor no tiene que ser tan grande como la cantidad de receptor para el cual la semaforina tiene un receptor de baja afinidad (p. ej., comprende una Km de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, o 10^{-3} M). Como se describe en la presente memoria, la cantidad de receptor en las células tumorales puede ser al menos 20 % del número total de receptores de semaforina en las células tumorales, o al menos 40% o al menos 50 %, o al menos 60 %, o al menos 70 %, o al menos 80 % del número total de receptores de semaforina en las células tumorales.

35 En consecuencia, los presentes inventores han hallado y describen en la presente memoria que si en las células tumorales se localiza una cantidad suficiente de receptores NP1, la semaforina más preferible para el tratamiento comprende Sema3A o Sema3D. Si en las células tumorales se localiza una cantidad suficiente de receptores NP2, la semaforina más preferible para el tratamiento comprende Sema3G o Sema3F. Si en las células tumorales se localiza una cantidad suficiente de receptores PlexD1, la semaforina más preferible para el tratamiento comprende Sema3E.

40 Se apreciará que la selección de la semaforina no sólo se basa en la cantidad de un receptor, sino también en el perfil de expresión de muchos subtipos de receptores de semaforinas. Por ejemplo, se sabe que las neuropilinas forman complejos espontáneos con varios miembros de la familia de receptores plexina. En consecuencia, la selección de la semaforina también se puede llevar a cabo basándose en el perfil de expresión del receptor neuropilina y del receptor plexina.

50 Los presentes inventores también han hallado y describen en la presente memoria que hay otro procedimiento para seleccionar una semaforina para el tratamiento de un cáncer. Las semaforinas que se había visto que inhibían el crecimiento independiente de anclaje de una célula tumoral concreta también se vio que eran eficaces para inhibir la formación de tumores. Un procedimiento para medir el crecimiento independiente de anclaje de las células tumorales se describe en el apartado Materiales y métodos de los ejemplos que hay más adelante en la presente memoria, y que implican la medición de colonias en agar blando.

55 Se apreciará que los agentes utilizados para detectar la expresión del receptor de semaforinas se pueden dar a conocer como un kit, tal como un kit autorizado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosis unitarias que contienen el agente activo (p. ej., anticuerpo o sonda capaz de interactuar específicamente con un subtipo de semaforina). El kit también puede comprender otros agentes útiles para analizar la expresión del receptor de semaforinas (p. ej., tamponantes adecuados, anticuerpos de control o sondas). Además, el kit puede comprender agentes utilizados para medir colonias tumorales en agar blando.

5 El kit puede venir acompañado de instrucciones para la administración. El kit puede también venir acompañado de una advertencia en una forma prescrita por un organismo público que regule la fabricación, uso o venta de sustancias farmacéuticas, en donde dicha advertencia refleje la autorización del organismo para la forma de las composiciones para la administración humana o veterinaria. Tal advertencia, por ejemplo, puede incluir el etiquetado autorizado por la Agencia del Medicamento de los EE.UU (FDA por su nombre en inglés).

Tras la selección, el tratamiento del cáncer se puede iniciar al poner en contacto (bien *in vivo* o *ex vivo*) las células cancerosas con un agente capaz de inducir la semaforina adecuada.

10 Por consiguiente, la presente invención contempla la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de la propia semaforina 3D, o la administración de polinucleótidos que codifican las semaforinas (a saber, genoterapia) a sujetos que lo necesitan para tratarles el cáncer.

15 Los polipéptidos de la semaforina 3D pueden comprender la secuencia completa de SEQ ID n.º 29. Alternativamente la semaforina puede ser al menos 95% homóloga a la SEQ ID N: 29 según se determina con el programa informático BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) con los parámetros de defecto) que comprendan actividad semaforina. El homólogo también podría hacer referencia a una delección, inserción o variante de sustitución, que incluye una sustitución de aminoácidos, del mismo y fragmentos de polipéptidos biológicamente activos del mismo.

20 La terminología «polipéptido», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un polímero de aminoácidos naturales o sintéticos, que abarcan péptidos nativos (bien productos de degradación, polipéptidos sintéticamente sintetizados o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, péptidos sintéticamente sintetizados), así como peptoides y semipeptoides que son análogos de polipéptido que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen a los péptidos incluso más estables mientras están en un organismo, o más capaces de penetrar en las células.

25 Tales modificaciones incluyen, pero sin limitarse a ellas, la modificación del extremo amino, la modificación del extremo carboxilo, la modificación del enlace polipeptídico, que incluye, pero sin limitarse a ellos, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones del esqueleto y modificación de restos. Los procedimientos para preparar los compuestos peptidomiméticos se conocen bien en la técnica y se especifican, por ejemplo, en *Quantitative Drug Design*, C.A. Ramsden Gd., capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). A continuación se ofrecen más detalles a este respecto.

30 Los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido se pueden sustituir, por ejemplo, por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-), enlaces éster (-C(R)H-C-O-O-C-(R)-N), enlaces cetometileno (-CO-CH₂), enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier alquilo, p. ej., metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂), enlaces tioamida (-CS-NH-), enlaces dobles olefínicos (-CH=CH-), enlaces retroamida (-NH-CO-), derivados polipeptídicos (-N(R)-CH₂-CO-), en donde R es la cadena lateral «normal», que aparece en la forma natural sobre el átomo de carbono.

35 Estas modificaciones se pueden producir en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena polipeptídica e incluso en varias (2 o 3) al mismo tiempo.

Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, se pueden sustituir por el ácido no natural sintético, tal como fenilglicina, TIC, naftilalanina (Nol), derivados metilados en el anillo de Phe, derivados halogenados de Phe o o-metil-Tyr.

40 Además de lo anterior, los polipéptidos de la semaforina 3D para uso en la presente invención también pueden incluir uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros no aminoacídicos (p. ej., ácidos grasos, glúcidos complejos, etc).

45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «aminoácido» o «aminoácidos» se sabe que incluye los 20 aminoácidos que aparecen en la naturaleza; los aminoácidos que a menudo se modifican postraduccionalmente *in vivo*, e incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos infrecuentes que incluyen, pero sin limitarse a ellos, el ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. Además, la terminología «aminoácido» incluye tanto los aminoácidos D como los L (estereoisómeros).

50 Las tablas 1 y 2 que vienen a continuación recogen los aminoácidos que aparecen en la naturaleza (tabla 1) y los aminoácidos no convencionales o modificados (tabla 2) que se pueden utilizar con la presente invención.

Tabla 1

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R

Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Cualquier aminoácido de los anteriores	Xaa	X

Tabla 2

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
Ácido α -aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
α -Amino- α -metilbutirato	Mgab	L-N-metilarginina	Nmarg
Carboxilato de aminociclopropano	Cpro	L-N-metilasparagina	Nmasn
		Ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
Ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-metilcisteína	Nmcys
Carboxilato de aminonorborno	Norb	L-N-metilglutamina	Nmgin
		Ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
Ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilhistidina	Nmhis
Ciclopentilalanina	Cpen	L-N-metilisoleucina	Nmile
D-Alanina	Dal	L-N-metil-leucina	Nmleu
D-Arginina	Darg	L-N-metil-lisina	Nmlys
Ácido D-aspártico	Dasp	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-Cisteína	Dcys	L-N-metilnorleucina	Nmnle
D-Glutamina	Dgln	L-N-metilorvalina	Nmnva
Ácido D-glutámico	Dglu	L-N-metilornitina	Nmorn
D-Histidina	Dhis	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-Isoleucina	Dile	L-N-metilprolina	Nmpro
D-Leucina	Dleu	L-N-metilserina	Nmser
D-Lisina	Dlys	L-N-metiltreonina	Nmthr
D-Metionina	Dmet	L-N-metilriptófano	Nmtrp

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
D-Ornitina	Dorn	L-N-metiltirosina	Nmtyr
D-Fenilalanina	Dphe	L-N-metilvalina	Nmval
D-Prolina	Dpro	L-N-metiletilglicina	Nmetg
D-Serina	Dser	L-N-metil- <i>t</i> -butilglicina	Nmtbug
D-Treonina	Dthr	L-norleucina	Nle
D-Triptófano	Dtrp	L-norvalina	Nva
D-Tirosina	Dtyr	α -metilaminoisobutirato	Maib
D-Valina	Dval	α -metil- γ -aminobutirato	Mgabu
D- α -metilalanina	Dmala	α -etilciclohexilalanina	Mchexa
D- α -metilarginina	Dmarg	α -metilciclopentilalanina	Mcpen
D- α -metilasparagina	Dmasn	α -metil- α -naftilalanina	Manap
D- α -metilaspártato	Dmasp	α -metilpenicilamina	Mpen
D- α -metilcisteína	Dmcys	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
D- α -metilglutamina	Dmgln	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
D- α -metilhistidina	Dmhis	N-(3-aminopropil)glicina	Norn
D- α -metilisoleucina	Dmile	N-amino- α -metilbutirato	Nmaabu
D- α -metil-leucina	Dmleu	α -naftilalanina	Anap
D- α -metil-lisina	Dmlys	N-bencilglicina	Nphe
D- α -metilmetionina	Dmmet	N-(2-carbamiletil)glicina	Nglu
D- α -metilornitina	Dmorn	N-(carbamiletil)glicina	Nasn
D- α -metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D- α -metilprolina	Dmpro	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D- α -metilserina	Dmser	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D- α -metiltreonina	Dmthr	N-cicloheptilglicina	Nchep
D- α -metilriptófano	Dmtrp	N-ciclohexilglicina	Nchex
D- α -metiltirosina	Dmtyr	N-ciclododecilglicina	Ncdec
D- α -metilvalina	Dmval	N-ciclododecilglicina	Ncdod
D- α -metilalanina	Dnmala	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D- α -metilarginina	Dnmarg	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D- α -metilasparagina	Dnmasn	N-cicoundecilglicina	Ncund
D- α -metilaspártato	Dnmasp	N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhm
D- α -metilcisteína	Dnmcys	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
D-N-metil-leucina	Dnmleu	N-(3-indoliletil)glicina	Nhtrp
D-N-metil-lisina	Dnmlys	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmet
D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metilriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletil)glicina	Nva

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
D-N-metiltirosina	Dnmtyr	N-metil- α -naftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
Ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-(<i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	Penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasparagina	Masn
L- α -metilaspartato	Masp	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
L- α -metilglutamina	Mgln	L- α -metilglutamato	Mglu
L- α -metilhistidina	Mhis	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
D-N-metilglutamina	Dnmgln	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(1-hidroxietil)glicina	Nthr
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxietil)glicina	Nser
D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(imidazoliletal)glicina	Nhis
D-N-metil-leucina	Dnmlau	N-(3-indoliletal)glicina	Nhtrp
D-N-metil-lisina	Dnmlys	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmet
D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metilriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletal)glicina	Nval
D-N-metiltirosina	Dnmtyr	N-metil- α -naftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
Ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-(<i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	Penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasparagina	Masn
L- α -metilaspartato	Masp	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
L- α -metilglutamina	Mgln	L- α -metilglutamato	Mglu
L- α -metilhistidina	Mhis	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
L- α -metilleucina	Mleu	L- α -metil-lisina	Mlys
L- α -metilmetionina	Mmet	L- α -metilnorleucina	Mnle
L- α -metilnorvalina	Mnva	L- α -metilornitina	Morn
L- α -metilfenilalanina	Mphe	L- α -metilprolina	Mpro
L- α -metilserina	Mser	L- α -metiltreonina	Mthr

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
L- α -metilvalina	Mtrp	L- α -metiltirosina	Mtyr
L- α -metilleucina	Mval Nnbhm	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhph
N-(N-(2,2-difeniletíl))		N-(N-(3,3-difenilpropil))	
carbamilmetil-glicina	Nnbhm	carbamilmetil(1)glicina	Nnbhe
1-carboxi-1-(2,2-difenil etilamino)ciclopropano	Nmbc		

Tal y como se menciona más arriba en la presente memoria, la semaforina 3D para uso en la presente invención puede comprender una sustitución conservativa o no conservativa.

5 La terminología «sustitución conservativa», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia al reemplazo de un aminoácido presente en la secuencia nativa del péptido por un aminoácido que se produce de forma natural o no natural o un peptidomimético que tiene unas propiedades estéricas similares. Cuando la cadena lateral del aminoácido nativo a reemplazar es polar o hidrófoba, la sustitución conservativa debe ser con un aminoácido que se produce de forma natural, un aminoácido que no se produce de forma natural o con un resto peptidomimético que es también polar o hidrófobo (además de tener las mismas propiedades estéricas que la
10 cadena lateral del aminoácido reemplazado).

Como los aminoácidos que se producen de forma natural se agrupan típicamente de acuerdo con sus propiedades, las sustituciones conservativas con aminoácidos que se producen de forma natural se pueden determinar con facilidad si se tiene en cuenta el hecho de que, de acuerdo con la invención, el reemplazo de los aminoácidos cargados por aminoácidos sin carga estéricamente similares se considera que son sustituciones conservativas.

15 Para producir sustituciones conservativas con aminoácidos que no se producen de forma natural, también es posible utilizar análogos de aminoácidos (aminoácidos sintéticos) bien conocidos en la técnica. Un peptidomimético del aminoácido que se produce de forma natural está bien documentado en la bibliografía conocida por el experto en la técnica.

20 Cuando afecta a las sustituciones conservativas, el aminoácido sustituyente debe tener en la cadena lateral el mismo grupo funcional que el aminoácido original o uno similar.

25 La frase «sustituciones no conservativas», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia al reemplazo del aminoácido que aparece en la secuencia original por otro aminoácido que se produce de forma natural o no natural, que tiene diferentes propiedades electroquímicas y/o estéricas. Así pues, la cadena lateral del aminoácido sustituyente puede ser significativamente mayor (o menor) que la cadena lateral del aminoácido nativo que se sustituye y/o puede tener grupos funcionales con propiedades electrónicas significativamente diferentes a las del aminoácido que se sustituye. Los ejemplos de sustituciones no conservativas de este tipo incluyen la sustitución de la alanina por fenilalanina o cicohexilmetilglicina, de la glicina por isoleucina o del ácido aspártico por -NH-CH[(-CH₂)₅-COOH]-CO-. Las sustituciones no conservativas que caen dentro del alcance de la presente invención son las que siguen constituyendo un péptido cuyas propiedades son como las de la semaforina.

30 Tal y como se menciona, la semaforina 3D para uso en la presente invención pueden comprender sustituciones. De acuerdo con una realización, la semaforina se puede manipular genéticamente para que sea resistente a la escisión mediante las proproteína convertasas de tipo furina. Así pues, por ejemplo, la secuencia de reconocimiento de la proproteína convertasa RFRR (SEQ ID n.º 39) se puede mutar en la secuencia KFKK (SEQ ID n.º 40). Esto se ha realizado en la semaforina 3B, con lo que los autores demostraron que esta mutación confería una resistencia
35 parcial a las proproteína convertasas de las células cancerosas sin perturbar la actividad biológica de la semaforina 3B completa [Varshavsky A., Kessler O., Abramovitch S., Kigel B., Zaffryar S. et al. (2008) *Cancer Res.* 68: 6922-6931]. En las SEQ ID n.º 33-38 se presentan los ejemplos de secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas de las semaforinas que son al menos parcialmente resistentes a las proproteína convertasas.

40 Tal y como se ha mencionado, los extremos amino y carboxilo de los péptidos de semaforina 3D para uso en la presente invención pueden estar protegidos por grupos funcionales. Los grupos funcionales adecuados se describen en Green y Wuts, «Protecting Groups in Organic Synthesis», John Wiley and Sons, capítulos 5 y 7, 1991. Los grupos protectores preferidos son los que facilitan el transporte del compuesto unido a éstos al interior de una célula, por ejemplo, al reducir la hidrofilia e incrementar la lipofilia de los compuestos.

45 Estos restos se pueden escindir *in vivo*, bien mediante hidrólisis o bien enzimáticamente, dentro de la célula. Los grupos protectores de hidroxilos incluyen grupos protectores éster, carbonato y carbamato. Los grupos protectores de amina incluyen grupos carbonilo alcoxi y ariloxi, tal y como se describe más arriba para los grupos protectores del extremo amino. Los grupos protectores de ácido carboxílico incluyen ésteres alifáticos, bencílicos y arílicos, tal y como se describe más arriba para los grupos protectores del extremo carboxilo. En una realización, el grupo de ácido carboxílico de la cadena lateral de uno o varios restos de ácido glutámico o de ácido aspártico de un péptido

de la presente invención está protegido, preferiblemente con un metilo, etilo, bencilo o éster de bencilo sustituido.

Los ejemplos de grupos protectores del extremo amino incluyen grupos acilo (-CO-R1) y grupos alcoxi carbonilo o ariloxi carbonilo (-CO-O-R1), en donde R1 es un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, aromático o aromático sustituido. Los ejemplos específicos de grupos acilo incluyen acetilo, (etil)-CO-, n-propil-CO-, iso-propil-CO-, n-butil-CO-, sec-butil-CO-, t-butil-CO-, hexilo, lauroílo, palmitoílo, miristoílo, estearilo, oleoílo, fenil-CO-, (fenil sustituido)-CO-, bencil-CO- y (bencil sustituido)-CO-. Los ejemplos de grupos alcoxi carbonilo y ariloxi carbonilo incluyen CH₃-O-CO-, (etil)-O-CO-, n-propil-O-CO-, iso-propil-O-CO-, n-butil-O-CO-, sec-butil-O-CO-, t-butil-O-CO-, fenil-O-CO-, (fenil sustituido)-O-CO-, bencil-O-CO-, (bencil sustituido)-O-CO-, y adamantano, naftaleno, miristoleílo, tolueno, bifenilo, cinamoílo, nitrobenzoílo, toluoílo, furoílo, benzoílo, ciclohexano, norbornano, Z-caproico. Para facilitar la N-acilación, en el extremo amino de la molécula pueden estar presentes de uno a cuatro restos de glicina.

El grupo carboxilo del extremo carboxilo del compuesto se puede proteger, por ejemplo, con una amida (a saber, el grupo hidroxilo del extremo carboxilo está reemplazado con -NH₂, -NHR₂ y -NR₂R₃) o un éster (a saber, el grupo hidroxilo del extremo carboxilo está reemplazado con -OR₂). R₂ y R₃ son independientemente un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido. Además, junto con el átomo de nitrógeno, R₂ y R₃ pueden formar un anillo heterocíclico de C4 a C8 con de aproximadamente 0 a 2 heteroátomos adicionales tales como nitrógeno, oxígeno o azufre. Los ejemplos de anillos heterocíclicos adecuados incluyen piperidinilo, pirrolidinilo, morfolino, tiomorfolino o piperazinilo. Los ejemplos de grupos protectores del extremo carboxilo incluyen -NH₂-, -NHCH₃-, -N(CH₃)₂-, -NH(etilo), -N(etilo)₂-, -N(metil)(etilo), -NH(bencilo), -N(alquil C₁-C₄)(bencilo), -NH(fenilo), -N(alquil C₁-C₄)(fenilo), -OCH₃-, -O-(etilo), -O-(n-propilo), -O-(n-butilo), -O-(iso-propilo), -O-(sec-butilo), -O-(t-butilo), -O-bencilo y -O-fenilo.

La semaforina 3D para uso en la presente invención también pueden comprender restos que no son aminoácidos, tales como, por ejemplo, restos hidrófobos (diferentes hidrocarburos lineales, ramificados, cíclicos, policíclicos o heterocíclicos y derivados de hidrocarburos) unidos a los péptidos; diferentes grupos protectores, en especial cuando el compuesto es lineal, que están unidos a los extremos del compuesto para disminuir la degradación. Los grupos químicos (no aminoácidos) presentes en el compuesto pueden haber sido incluidos para mejorar diferentes propiedades fisiológicas; disminuir la degradación o eliminación; disminuir la repulsión mediante diferentes bombas celulares; mejorar las actividades inmunógenas; mejorar diferentes modos de administración (tales como la adhesión de diferentes secuencias que permiten la penetración a través de diferentes barreras, a través de intestino, etc.); incrementar la especificidad; incrementar la afinidad; disminuir la toxicidad, y similares.

De acuerdo con una realización, las semaforinas 3D para uso en la presente invención están unidas a un potenciador de la liberación prolongada. Los ejemplos de potenciadores de la liberación prolongada incluyen, pero sin limitarse a ellos, ácido hialurónico (HA), ácido algínico (AA), metacrilato de polihidroxietilo (Poly-HEMA), polietilenglicol (PEG), dimetoxietano y poliisopropilacrilamida.

La unión del componente de la secuencia aminoacídica de las semaforinas de la invención a otros agentes que no son aminoácidos se puede hacer mediante un enlace covalente, mediante complejo no covalente, por ejemplo, mediante la complejación a un polímero hidrófobo que puede ser degradado o escindido para producir un compuesto capaz de ofrecer la liberación prolongada; mediante el atrapamiento de la parte aminoacídica de la semaforina en liposomas o micelas para producir la semaforina final para uso en la invención. La asociación puede ser mediante el atrapamiento de la secuencia aminoacídica dentro de otro componente (liposoma, micela) o la impregnación de la secuencia aminoacídica dentro de un polímero para producir el péptido final para uso en la invención.

Las semaforinas para uso en la presente invención se pueden sintetizar bioquímicamente tal como utilizando técnicas en fase sólida estándares. Estos procedimientos incluyen la síntesis en fase sólida exclusiva, procedimientos de síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos, síntesis clásica en solución. Los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida se conocen bien en la técnica y además están descritos en John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, *Solid Phase Polypeptide Syntheses* (2.^a ed., Pierce Chemical Company, 1984).

También se pueden utilizar técnicas recombinantes para generar las semaforinas para uso en la presente invención. Estas técnicas se pueden preferir debido al número de aminoácidos de un polipéptido de semaforina y a la gran cantidad que se requiere del mismo. Tales técnicas recombinantes se describen en Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153: 516-544, Studier et al., (1990) *Methods in Enzymol.* 185: 60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310: 511-514; Takamatsu et al., (1987) *EMBO J.* 6: 307-311, Coruzzi et al., (1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680 y Brogli et al., (1984) *Science* 224: 838-843, Gurley et al., (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565 y Weissbach y Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, apartado VIII, págs. 421-463.

Para producir un vector de expresión para la expresión de las semaforinas, un polinucleótido que codifica la semaforina se liga en un vector de expresión de ácido nucleico, que comprende la secuencia polinucleotídica bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora en *cis* (p. ej., secuencia promotora) adecuada para dirigir la transcripción constitutiva, específica del tejido o inducible de la semaforina en las células hospedadoras.

La frase «un polinucleótido aislado» hace referencia a una secuencia de ácido nucleico monocatenario o bicatenario que se aísla y se proporciona en la forma de una secuencia de ARN, una secuencia polinucleotídica complementaria (ADNc), una secuencia polinucleotídica genómica y/o una secuencia polinucleotídica compuesta (p. ej., una combinación de lo anterior).

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «secuencia polinucleotídica complementaria» hace referencia a una secuencia que surge de la transcripción inversa del ARN mensajero mediante una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. Tal secuencia se puede amplificar posteriormente *in vivo* o *in vitro* con una ADN polimerasa dependiente del ADN.

10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «secuencia polinucleotídica genómica» hace referencia a una secuencia que procede (se aísla) de un cromosoma y así pues representa una porción contigua de un cromosoma.

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «secuencia polinucleotídica compuesta» hace referencia a una secuencia que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. Una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exónicas que se necesitan para codificar la semaforina de la presente invención, así como algunas secuencias intrónicas que se interponen entre ellas. Las secuencias intrónicas pueden tener cualquier origen, que incluye de otros genes, y típicamente incluirán las secuencias señal de ajuste conservadas. Tales secuencias intrónicas pueden además incluir elementos reguladores de la expresión que actúan en *cis*.

20 Tal y como se menciona más arriba en la presente memoria, las secuencias polinucleotídicas se insertan en los vectores de expresión (a saber, una construcción de ácido nucleico) para permitir la expresión de la semaforina recombinante. El vector de expresión puede incluir otras secuencias que convierten este vector en adecuado para la replicación e integración en procariontes, eucariotes o preferiblemente en ambos (p. ej., vectores lanzadera). Los vectores de clonación típicos contienen secuencias de inicio de la transcripción y traducción (p. ej., promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y la traducción (p. ej., señales de poliadenilación).

25 Para expresar las semaforinas se pueden utilizar muchas células procariontes o eucariotes como sistemas de expresión en el hospedador. Estas incluyen, pero sin limitarse a ellas, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un vector de expresión recombinante de ADN de bacteriófago, de ADN plasmídico o de ADN de cósmido, que contiene la secuencia codificante de la semaforina; levadura transformada con los vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante de la semaforina; sistemas de células vegetales infectadas con los vectores de expresión víricos recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes, tales como plásmido Ti, que contienen la secuencia codificante de la semaforina.

30 Además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica la semaforina), la construcción para expresión también puede incluir secuencias manipuladas genéticamente para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad de la semaforina expresada.

35 Se pueden utilizar diferentes procedimientos para introducir un vector de expresión en el sistema de células hospedadoras. Tales procedimientos se describen de forma general en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992) en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and their Uses*. Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al., [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, la transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con los vectores víricos recombinantes. Además, véanse las patentes de los EE.UU. n.º 5,464,764 y 5,487,992 para los procedimientos de selección positiva-negativa.

45 Las células transformadoras se cultivan en condiciones eficaces que permiten la expresión de una gran cantidad del péptido recombinante. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero sin limitarse a ellas, condiciones eficaces de temperatura, pH, oxígeno, medios y biorreactores, que permiten la producción de proteínas. Un medio eficaz hace referencia a cualquier medio en el cual una célula se cultiva para producir la semaforina recombinante para uso en la presente invención. Tal medio típicamente incluye una solución acuosa que tiene una fuente asimilable de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas, apropiados. Las células se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. El cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno adecuados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo se encuentran dentro de los conocimientos del experto en la técnica.

55 Según el vector y el sistema hospedador utilizado para la producción, las semaforinas resultantes pueden permanecer dentro de la célula recombinante, o bien ser secretadas al medio de fermentación, o bien ser secretadas en un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplásmico en *E. coli*, o bien quedar retenidas en la superficie externa de una célula o membrana vírica.

La semaforina recombinante se recupera después de un tiempo predeterminado en cultivo.

La frase «recuperar la semaforina recombinante» hace referencia a recoger todo el medio de fermentación que contiene la semaforina y sin que necesite necesariamente otras etapas de separación o purificación.

5 Así pues, las semaforinas para uso en la presente invención se pueden purificar con una serie de técnicas estándares de purificación de proteínas, tales como, pero sin limitarse a ellas, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatoenfoque y solubilización diferencial.

10 Para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada se puede manipular genéticamente para que codifique una semaforina fusionada a un resto escindible. Tal proteína de fusión se puede diseñar de tal forma que la semaforina se pueda aislar fácilmente por cromatografía de afinidad; p. ej., mediante inmovilización en una columna específica para el resto escindible. Cuando se introduce por manipulación genética un sitio de escisión entre la semaforina y el resto escindible, la semaforina puede liberarse de la columna cromatográfica mediante el tratamiento con una enzima o agente apropiados que escinden específicamente la proteína de fusión por este sitio [p. 15 ej., véase Booth et al., *Immunol. Lett.*, 19: 65-70 (1988); y Gardella et al., *J. Biol. Chem.* 265:15854-15859 (1990)].

La semaforina para uso en la presente invención se recupera preferiblemente en una forma «sustancialmente pura».

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «sustancialmente pura» hace referencia a una pureza que garantiza el uso eficaz de la semaforina en las aplicaciones descritas en la presente memoria.

20 Además de poderse sintetizar en las células hospedadoras, la semaforina para uso en la presente invención también se puede sintetizar con sistemas de expresión *in vitro*. Estos procedimientos se conocen bien en la técnica y los componentes del sistema están disponibles en el mercado.

Tal y como se menciona, la semaforina se puede administrar al sujeto que la necesita como polinucleótidos, en donde se expresan *in vivo*, esto es, genoterapia.

25 La terminología «genoterapia», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a la transferencia del material genético (p. ej., ADN o ARN) de interés al interior de un hospedador para tratar o prevenir una enfermedad o afección genética o adquirida o fenotipo. El material genético de interés codifica un producto (p. ej., una proteína, polipéptido, péptido, ARN funcional, antisentido) cuya producción se desea *in vivo*. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una hormona, receptor, enzima, polipéptido o péptido de valor terapéutico. Para una revisión, véase, en general, el texto «Gene Therapy» (*Advanced in Pharmacology 40*, Academic Press, 1997).

30 Han evolucionado dos estrategias básicas en la genoterapia: genoterapia (1) *ex vivo* y (2) *in vivo*. En la genoterapia *ex vivo*, las células se retiran de un paciente y, mientras se cultivan, se tratan *in vitro*. Por lo general, se introduce un gen de reemplazo funcional en la célula mediante un vehículo o procedimiento de administración génica apropiado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión cuando sea necesario, y entonces las células modificadas se expanden en el cultivo y se devuelven al hospedador o paciente. Se ha 35 demostrado que estas células reimplantadas genéticamente expresan *in situ* el material genético transfectado. Las células pueden ser autólogas o heterólogas al sujeto. Ya que las células heterólogas es más probable que induzcan una reacción inmunitaria cuando se administran al organismo, se han desarrollado varias estrategias para reducir la probabilidad de rechazo de las células heterólogas. Estas incluyen deprimir el sistema inmunitario del destinatario o bien encapsular las células heterólogas en membranas semipermeables e inmunoaislantes antes del trasplante.

40 En la genoterapia *in vivo*, las células diana no se retiran del sujeto, sino que el material genético a transferir se introduce *in situ* en las células del organismo del destinatario, esto es dentro del destinatario. Estas células genéticamente alteradas se ha demostrado que expresan *in situ* el material genético transfectado.

Para conferir especificidad, las construcciones de ácido nucleico utilizadas preferiblemente para expresar las semaforinas comprenden elementos de secuencias promotoras específicos de la célula.

45 Los vectores víricos recombinantes son útiles para la expresión *in vivo* de las semaforinas ya que ofrecen ventajas tales como la infección lateral y la especificidad de diana. La infección lateral es inherente al ciclo de vida de, por ejemplo, retrovirus y es el proceso mediante el cual una única célula infectada produce una progenie con muchos viriones que brotan de ella e infectan las células circundantes. El resultado es que se infecta muy rápidamente una gran área en la que la mayoría de las células no estaba infectada inicialmente por las partículas víricas originales. 50 Esto se contrapone al tipo de infección vertical en el cual el agente infeccioso se extiende sólo a la progenie hija. También se pueden producir vectores víricos que sean incapaces de diseminarse lateralmente. Esta característica puede ser útil si el propósito deseado es introducir un gen concreto destinado sólo a un número localizado de células.

Los presentes inventores han demostrado que, al igual que tienen un efecto directo sobre las células tumorales, las semaforinas también influyen en la angiogénesis mediante la interacción con receptores de las células endoteliales.

Así pues, al igual que para el tratamiento del cáncer, en la presente memoria se describe que las semaforinas también pueden tratar otros trastornos asociados a la angiogénesis.

5 Las enfermedades relacionadas con la angiogénesis incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias e infecciosas; cáncer dependiente de la angiogénesis, que incluye, por ejemplo tumores sólidos, tumores de transmisión hemática tales como leucemias y metástasis tumorales; tumores benignos, por ejemplo, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas y granulomas piógenos; artrosis; psoriasis; eccema; angiopatías oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad, degeneración macular, rechazo del injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis; síndrome de Osler-Webber; angiogénesis de miocardio; neovascularización de placas; telangiectasia; artropatía hemofílica; angiofibroma; y
10 granulación de las heridas. Además, las composiciones de esta invención se pueden utilizar para tratar enfermedades tales como, pero sin limitarse a ellas, adherencias intestinales, aterosclerosis, esclerodermia, verrugas y cicatrices hipertróficas (a saber, queloides). Las composiciones de esta invención también pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades en las que la angiogénesis es una consecuencia patológica, tal como linforreticulosis benigna (*Rochele minalia quintosa*), úlceras (*Helicobacter pylori*), tuberculosis y lepra.

15 Las semaforinas o los polinucleótidos que las codifican se pueden administrar a un sujeto por sí solas o pueden formar parte de una composición farmacéutica.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «composición farmacéutica» hace referencia a una preparación de uno o varios de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar
20 la administración de un compuesto a un organismo.

En la presente memoria, la terminología «ingrediente activo» hace referencia a la semaforina responsable del efecto biológico.

De aquí en adelante, las frases «vehículo fisiológicamente aceptable» y «vehículo farmacéuticamente aceptable», que se pueden usar indistintamente, hacen referencia a un vehículo o un diluyente que no ocasiona ninguna irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. En estas frases se incluye un adyuvante.
25

En la presente memoria, la terminología «excipiente» hace referencia a un sustancia inerte que se añade a una composición farmacéutica para facilitar más la administración de un ingrediente activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diferentes azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.
30

Las técnicas para la formulación y administración de los fármacos se puede encontrar en «Remington's Pharmaceutical Sciences», Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, transmucosa, especialmente trasnasal, intestinal o parenteral, entre ellas las inyecciones intramuscular, subcutánea e intramedular, así como la inyección intratecal, intraventricular directa, intracardiaca, p. ej., en la cavidad del ventrículo derecho o izquierdo, en la arteria coronaria común, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.
35

Las estrategias convencionales para la administración del fármaco al sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (p. ej., inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (p. ej., producción de una proteína quimérica de fusión que comprende un péptido transportador que tiene afinidad por una molécula de la superficie de las células endoteliales en combinación con un agente que es incapaz de cruzar la BHE por sí solo) en un intento de explotar una de las vías de transporte endógeno de la BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para incrementar la liposolubilidad de un agente (p. ej., conjugación de agentes hidrosolubles a vehículos lipídicos o colesterol); y la alteración transitoria de la integridad de la BHE mediante ruptura hiperosmótica (que se consigue con la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina). Sin embargo, cada una de estas estrategias tiene limitaciones, tales como los riesgos inherentes asociados a un procedimiento quirúrgico invasivo, un límite del tamaño impuesto por una limitación inherente de los sistemas del transporte endógeno, unos efectos secundarios biológicos potencialmente indeseables con la administración sistémica de una molécula quimérica que comprende un motivo vehicular que podría ser activo fuera del SNC, y el posible riesgo de daño cerebral dentro de las regiones del cerebro en las que se ha roto la BHE, que las convierten en procedimientos de administración subóptimos.
40
45
50

Otra posibilidad sería que se pueda administrar la composición farmacéutica de una manera local en vez de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección de la composición farmacéutica directamente en una región del tejido de un paciente.

55 Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., por medio métodos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Así pues, las composiciones farmacéuticas para el uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional con uno o varios vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden utilizar desde el punto de vista farmacéutico. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

- 5 Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa en la formulación se utilizan los penetrantes adecuados para la barrera a permear. Tales penetrantes se conocen de forma general en la técnica.

- 10 Para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente mediante la combinación de los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten formular la composición farmacéutica como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones viscosas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacéuticas para el uso oral se pueden fabricar con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir adyuvantes adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, sustancias de relleno tales como azúcares, entre ellos lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir disgregantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar o ácido alginico, o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

- 15 Los núcleos de las grageas se proporcionan con los revestimientos adecuados. Para este propósito se pueden utilizar soluciones concentradas de glúcidos que pueden opcionalmente contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, Carbopol® en gel, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones laqueantes y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes. Se puede añadir materia colorante o pigmentos a los revestimientos de los comprimidos o grageas para identificarlas o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de los compuestos activos.

- 20 Las composiciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener los ingredientes activos en mezcla con una sustancia de relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en los líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben ir en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

- 25 Para la administración yugal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

- 30 Para la administración mediante inhalación nasal, los ingredientes activos para el uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación en aerosol para pulverización en un envase presurizado o en un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para ser usados en un dispensador que contiene una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- 35 La composición farmacéutica descrita en la presente memoria se puede formular para la administración parenteral, p. ej., mediante una inyección de bolo o una venoclisis continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitarias, p. ej., en ampollas o en contenedores de múltiples dosis con la adición optativa de un conservante. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

- 40 Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en una forma hidrosoluble. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones para inyección acuosas u oleosas. Los solventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. De forma optativa, la suspensión puede también contener estabilizantes adecuados o agentes que incrementan la solubilidad de los ingredientes activos para garantizar la preparación de soluciones muy concentradas.

Otra posibilidad sería que el ingrediente activo pueda estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo

adecuado, p. ej., una solución estéril en agua sin pirógenos, antes de ser usada.

La composición farmacéutica de la presente invención también se puede formular en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, utilizando, p. ej., bases convencionales para supositorios tales como mantequilla de cacao u otros glicéridos.

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito deseado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos (semaforinas) que es eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (p. ej., cáncer) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

10 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está suficientemente dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica, en especial a la luz de la descripción detallada dada a conocer en la presente memoria.

Para cualquier preparación utilizada en los tratamientos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo de células e *in vitro*. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o titulación deseadas. Tal información se puede utilizar para determinar de forma más exacta las dosis útiles en los humanos.

15 La toxicidad y eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente memoria se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares *in vitro*, en cultivos de células o en animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo de células e *in vitro* y de estudios con animales se pueden utilizar para formular un margen de dosis para ser utilizado en los humanos. La dosis puede variar según la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada: la formulación exacta, la vía de administración y la dosis las puede elegir cada médico en vista de la afección del paciente (véase, p. ej., Fingi et al., 1975, en «The Pharmacological Basis of Therapeutics», capítulo 1, pág. 1).

20 La cantidad y el intervalo de las dosis se pueden ajustar por separado para asegurar que la concentración del ingrediente activo es suficiente para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará en cada preparación, pero se puede estimar a partir de los datos *in vitro*. Las dosis necesarias para conseguir la CEM dependerá de las características de cada individuo y de la vía de administración. Los ensayos de detección se pueden utilizar para determinar las concentraciones plasmáticas.

25 Según la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser única o múltiple, y el ciclo de tratamiento puede durar desde varios días a varias semanas o hasta que se logra la curación o se consigue disminuir el estado morbosos.

30 La cantidad de una composición a administrar será por supuesto dependiente del sujeto a tratar, de la gravedad de la afección, de la vía de administración, del criterio del médico prescriptor, etc.

35 Las composiciones para uso en la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit autorizado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosis unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina de plástico o metal, tal como un envase alveolado o blíster. El envase o dispositivo dispensador puede venir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispositivo dispensador también puede estar acondicionado con un aviso pegado en el contenedor en una forma prescrita por un organismo público que regula la fabricación, uso o venta de sustancias farmacéuticas, en donde dicho aviso recoge la autorización del organismo público para la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Tal aviso, por ejemplo, puede ser de etiquetado autorizado por la Agencia del Medicamento de los EE.UU. (FDA, por su nombre en inglés) para fármacos con receta o de un prospecto autorizado. También se pueden preparar las composiciones que comprenden una preparación para uso en la invención formuladas en un vehículo farmacéutico compatible, colocadas en un contenedor adecuado y etiquetadas para el tratamiento de una afección indicada, como se describe con más detalle más arriba.

45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «aproximadamente» hace referencia a $\pm 10\%$.

La terminología «comprende», «que comprende», «incluye», «que incluye», «que tiene» y sus conjugados significan «que incluye pero no se limita a».

La terminología «que consiste en» significa «que incluye y se limita a».

50 La terminología «que consiste esencialmente en» significa que la composición puede incluir otros ingredientes, etapas y/o partes, pero sólo si los otros ingredientes, etapas y/o partes no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición que se reivindica.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «procedimiento» hace referencia a maneras, medios, métodos y técnicas con los que llevar a término una tarea dada que incluye, pero sin limitarse a ellos, las maneras, medios, métodos y técnicas bien conocidos por los expertos en las técnicas química, farmacológica, biológica,

bioquímica y médica, o que éstos pueden fácilmente desarrollar a partir de las maneras, medios, métodos y técnicas conocidos.

A continuación se delinearán diversas realizaciones y aspectos de la presente invención y tal como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

5 Ejemplos

Ahora se hace referencia a los ejemplos que vienen a continuación que, junto las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

Por lo general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» Sambrook et al., (1989); «Current Protocols in Molecular Biology», volúmenes I-III, Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, «A Practical Guide to Molecular Cloning», John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., «Recombinant DNA», Scientific American Books, New York; Birren et al., (eds.) «Genome Analysis: A Laboratory Manual Series», vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las presentadas en las patentes de los EE.UU. n.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; «Cell Biology; A Laboratory Handbook», volúmenes I-III Cellis, J. E., ed., (1994); «Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique» de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; «Current Protocols in Immunology», volúmenes I-III, Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds.), «Basic and Clinical Immunology» (8.^a edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), «Selected Methods in Cellular Immunology», W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen exhaustivamente en las patentes y la bibliografía científica, véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. n.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; «Oligonucleotide Synthesis» Gait, M. J., ed. (1984); «Nucleic Acid Hybridization» Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); «Transcription and Translation» Hames, B. D.; y Higgins S. J., eds. (1984); «Animal Cell Culture» Freshney, R. I., ed. (1986); «Immobilized Cells and Enzymes» IRL Press, (1986); «A Practical Guide to Molecular Cloning» Perbal, B. (1984) y «Methods in Enzymology», vol. 1-317, Academic Press; «PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications», Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., «Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual» CSHL Press (1996). Otras referencias generales se dan a conocer a lo largo de este documento. Los procedimientos de este documento se cree que se conocen bien en la técnica y se dan a conocer para la comodidad del lector.

Ejemplo 1 Las semaforinas de clase 3 inhiben el desarrollo de tumores procedentes de cáncer de mama al actuar selectivamente sobre las células tumorales que expresan el receptor

Material y métodos

35 Material: los anticuerpos dirigidos contra la acción β y contra las etiquetas de los epítomos myc y FLAG, así como las sustancias químicas, eran de Sigma (St. Louis, MI). Los medios y los sueros para el cultivo celular eran de Biological-Industries Inc. (Kibbutz BethHaemek, Israel). El Fugene® 6 se obtuvo de Roche Ltd (Suiza). Los anticuerpos dirigidos contra np1 y np2 se compraron a Santa Cruz Inc. (San Diego, CA). Los ADNc que codifican diferentes semaforinas se clonaron en el vector de expresión lentivírico NSPI-CMV-MCS-myc-His que contiene el promotor de SV40 que sirve para expresar el marcador de selección de la puomicina. Los anticuerpos dirigidos contra CD-31 eran de BD Biosciences Pharmingen. El kit de PCR inversa de ARN PerfectPure era de 5-Prime (Gaithersburg, MD).

45 Plásmidos de expresión: los ADNc de sema3A, sema3F y sema3E se subclonaron en el vector de expresión lentivírico NSPI-CMV-myc-his. El ADNc de sema3G se clonó del ARNm a partir de las HUVEC por RT-PCR. El ADNc de sema3D se clonó por RT-PCR a partir de las HUVEC tratadas con 30 ng/ml del VEGF durante 6 horas. Los ADNc que codifican la sema3D y la sema3G también se subclonaron en el vector de expresión NSPI. Los ADNc que contienen la etiqueta del epítomo myc se añadieron en fase delante del codón de parada de sema3D, sema3E, sema3F y sema3G. Se añadió una etiqueta del epítomo FLAG delante del codón de parada de sema3A según está descrito [Guttman-Raviv et al., 2007, *J. Biol. Chem.* 282: 26294-26305].

50 Generación de lentivirus recombinantes e infección de la célula con los lentivirus: las células HEK293-T se inocularon en placas de cultivo de tejidos de 100 mm (2,5 x 10⁶ células por placa). Un día después de la inoculación, las células se transfectaron simultáneamente con el plásmido de expresión lentivírico adecuado (8 μ g), con el vector de empaquetamiento pCMVdR8.91 (5 μ g) y con un plásmido que codifica la envoltura de revestimiento del virus de la estomatitis vesicular pMD2-VSVG (2 μ g), con el uso de Fugene® 6 de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El medio acondicionado que contiene las partículas lentivíricas infecciosas se recogió 48 horas y 72 horas después de la transfección. Se añadió Polybrene® (8 μ g/ml) al medio acondicionado y se incubó 8 horas con las células deseadas.

Líneas celulares: las células sin micoplasmas procedentes de cáncer de mama MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-

MB-468 y MCF7 se obtuvieron de la ATCC. Las células se cultivaron en DMEM que contenía 4,5 mg/ml de glucosa complementado con STF al 10% y antibióticos. Las células HUVEC, PAE, HEK293 y HEK293-T se cultivaron como se describió previamente [Kessler O. et al., 2004, *Cancer Res.* 64: 1008-1015]. Las HUVEC se utilizaron entre los pases 3 y 7.

5 Ensayos de formación de tumores *in vivo*: las células que expresan las semaforinas o las células de control infectadas con los vectores lentivíricos vacíos se implantaron (5×10^6 /ratón) en las almohadillas de grasa de la mama de ratonas hembra balb/c nu/nu de 4 a 6 semanas de edad (Harlan Laboratories). En la mayoría de los experimentos se utilizaron grupos de 9 animales/experimento. Se midieron los tumores dos veces por semana con un calibrador. Se determinó el volumen tumoral (V) con la fórmula $V = 0,52 \times A^2 \times B$, en la que A es el diámetro corto y B es el largo. Cuando los tumores MDA-MB-231 alcanzaron un volumen medio de 200 a 300 mm³, se extirparon y se pesaron. Cada experimento se repitió al menos dos veces para confirmar los resultados. Se utilizaron microgránulos de estrógenos en los experimentos en los que se determinó el desarrollo de los tumores de células MCF-7 según está descrito previamente [Akiri G. et al., 2003, *Cancer Res.* 63: 1657-1666].

15 Inmunohistoquímica: los tumores se incluyeron en OCT y se congelaron en 2-metilbutano enfriado en nitrógeno líquido. A continuación se laminaron en cortes gruesos de 30 µm con un criótomo. Los cortes se bloquearon con acetona fría, y se hicieron reaccionar con un anticuerpo dirigido contra el marcador endotelial CD-31, se tiñó para contrastar con hematoxilina, y se fotografió. Se fotografiaron 8 campos diferentes al microscopio procedentes de diferentes cortes de tres tumores diferentes. Estas fotografías se tomaron de áreas en donde la densidad de los vasos sanguíneos era más alta (método de puntos calientes) [Vermeulen, P. B., 1996, *Eur. J. Cancer* 32A: 2474-2484]. El área de los vasos sanguíneos en los campos con la misma superficie se cuantificó con el programa informático Image Pro Plus.

25 Transferencias Western: se prepararon lisados celulares y se determinó la concentración de proteínas según se describió previamente [Guttman-Raviv, 2007, *J. Biol. Chem.* 282: 26294-26305]. Para determinar la concentración de las sema3 secretadas en los medios acondicionados de las diferentes líneas celulares, las células se inocularon en placas de 12 pocillos a una concentración de 2×10^5 células/pocillo. Las células se incubaron durante 48 horas en 0,4 ml del medio sin suero. Se analizaron alícuotas del mismo volumen mediante análisis por transferencia Western para detectar la presencia de las sema3 con anticuerpos dirigidos contra la etiqueta adecuada de los epítomos myc o FLAG, según se describió previamente [Guttman-Raviv, 2007, *J. Biol. Chem.* 282: 26294-26305]. Ninguna de las semaforinas expresadas alteraron la tasa de proliferación ni la tasa supervivencia de las diferentes líneas celulares (no se muestran los datos).

30 Ensayo de proliferación: las células tumorales (10^4 células/pocillo) se inocularon por triplicado en placas de 24 pocillos. Las células adheridas se digirieron con tripsina y se contaron cada 24 horas durante 4 días con un contador Coulter. Los datos se representaron en un gráfico semilogarítmico en el que la pendiente de la curva representa la tasa de crecimiento de la línea celular.

35 Ensayo de adherencia: en los experimentos de adherencia celular se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos sin recubrir así como placas de 12 pocillos no adherentes revestidos con fibronectina (5 µl/ml). Las células tumorales (10^5 células/pocillo) se inocularon por triplicado en el medio de crecimiento. Las células se lavaron dos veces con PBS, se digirieron con tripsina para liberar las células adheridas y se contaron con un contador Coulter. Las células se contaron 5, 10, 20 y 45 minutos después de que se inocularan. Se calculó entonces el porcentaje de células adheridas respecto al número de células inoculadas y se representó en un gráfico. El tiempo requerido para que se adhieran el 50% de las células inoculadas se utilizó como una medición con la que comparar las propiedades de adherencia de las células de control y de las células que expresan la semaforina.

40 Ensayo de repulsión de las células endoteliales: se realizaron ensayos de repulsión de células esencialmente según está descrito [Guttman-Raviv, 2007, *J. Biol. Chem.* 282: 26294-26305].

45 Ensayo de formación de colonias en agar blando: una primera capa de agar que contiene 2 ml de agar de bajo punto de fusión (Bio-Rad) al 0,5% disuelto en el medio de crecimiento se vertió en los pocillos de una placa de 6 pocillos para cultivo de células y se dejó polimerizar a 4 °C durante 20 minutos. Una segunda capa (1 ml) que contenía agar de bajo punto de fusión al 0,3% disuelto en el medio de crecimiento que contiene las células (3×10^3 /ml) se colocó en la parte superior de la primera capa y se dejó estar a 4 °C durante 20 minutos. El medio de crecimiento (2 ml) se añadió en la parte superior de la segunda capa y las células se incubaron en un incubador humidificado a 37 °C durante 21 días con cambio del medio dos veces a la semana. Al final del experimento, las colonias se tiñeron durante 1 hora con violeta de genciana al 0,005%, y se incubaron con PBS durante una noche para retirar el exceso de violeta de genciana. Las colonias se fotografiaron, y las colonias con un diámetro de 150 µm o más se contaron con el programa morfométrico Image-Pro.

55 Análisis estadístico: el análisis estadístico se realizó con los datos sin emparejar con una prueba la *t* de Student de varianzas desiguales. Las barras de error representan el error estándar de la media. La significación estadística se presenta de la manera siguiente: * *p* < 0,05, ** *p* < 0,01 y *** *p* < 0,001.

Resultados

Perfiles de expresión de los receptores de semaforinas de clase 3 en las líneas celulares procedentes de cáncer de mama: las semaforinas pueden influir en el desarrollo de los tumores mediante varios mecanismos, que incluyen efectos directos sobre las células tumorales, efectos sobre la angiogénesis y efectos sobre las células del estroma. Para encontrar si las semaforinas de clase 3 sema3A, sema3D, sema3E, sema3F y sema3G pueden influir en la formación de tumores a partir de las células de cáncer de mama mediante la influencia directa sobre el comportamiento de las células tumorales, los presentes inventores determinaron primero los perfiles de expresión de los receptores de sema3 conocidos en las células. Los diferentes tipos de células procedentes de cáncer de mama expresaban de forma diferente los receptores de sema3. Las células MDA-MB-231 expresan predominantemente np1, un receptor de la sema3A y de la sema3D, pero muy poco np2 o nada de él. Por otra parte, las células MDA-MB-435 expresan predominantemente np2, un receptor de la sema3F y la sema3G, y muy poco o nada de np1. Las células MCF-7 expresan np1 (aunque en menos cantidad que las células MDA-MB-231) y no expresan np2 (figura 1A).

Debido a que su dominio intracelular es muy pequeño, las neuropilinas no pueden transducir señales de las sema3 por sí solas y forman complejos con las plexinas, de manera que las plexinas sirven de elemento de transducción de la señal. Las cuatro líneas celulares expresaban plexA1 y todas excepto las células MDA-MB-468 expresaban plexA2. Sin embargo, ninguna de las líneas celulares procedentes del cáncer de mama expresaban plexA4 y sólo las células MCF-7 expresaban un poco de plexA3 (figuras 1B-C). El ARNm que codifica PlexD1, el receptor de la sema3E, se expresaba en MDA-MB-231 y MCF-7, mientras que las células MDA-MB-435 lo expresaba en menos cantidad y las células MDA-MB-468 no lo expresaban en absoluto (figura 1B-C).

Los efectos de las diferentes sema3 sobre el desarrollo de tumores a partir de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-468 y MCF-7: para determinar los efectos de sema3A, sema3D, sema3E, sema3F y sema3G sobre las líneas celulares de cáncer de mama, los ADNc completos que codifican las cinco semaforinas (o un control del vector de expresión vacío) se expresaron en las células con vectores lentivíricos que llevan un marcador de selección que confiere resistencia a la puomicina. Se seleccionaron conjuntos de células infectadas y se les examinó la expresión de la semaforina mediante análisis por transferencia Western con anticuerpos dirigidos contra la etiqueta del epítipo incorporado en las semaforinas recombinantes. Las sema3 contiene los sitios de escisión conservados para las proproteína convertasas de tipo furina y, en el caso de la sema3E, el producto escindido posee propiedades prometastásicas. Sin embargo, había sólo una escisión mínima de cualquiera de las semaforinas recombinantes en las células MDA-MB-231 o en las células MDA-MB-435 (no se muestran los datos). Las células MDA-MB-231 se implantaron posteriormente en las almohadillas de grasa de la mama de ratonas con inmunidad deficiente, y se dejaron desarrollar en tumores. En el caso de las células MDA-MB-231 se vio que se expresaban con eficacia todas las semaforinas que se analizaron (figuras 2A, D, G y J). La expresión de la sema3A, agonista de np1, inhibió casi completamente el desarrollo de tumores a partir de estas células (figuras 2B-C). La sema3D es un agonista de np1 y de np2. La sema3D inhibió completamente la formación de tumores en un experimento (no se muestran los datos) y en otro experimento inhibió fuertemente, aunque no completamente, el desarrollo de tumores (figuras 2E-F). En cambio, la sema3G, agonista de np2, no fue capaz de inhibir el desarrollo de tumores a partir de las células MDA-MB-231 (figuras 2K-L). Por otra parte, la expresión de la sema3F, agonista de np2, inhibió significativamente el desarrollo de tumores desde estas células a pesar de la ausencia de receptores np2. Los tumores que desarrollaron a partir de las células MDA-MB-231 que expresan la sema3F (figura 2C) parecían menos irrigados que los tumores de control, lo que sugiere que la sema3F inhibía la angiogénesis tumoral (figura 2A). La expresión de la sema3E, agonista de PlexD1, también inhibió significativamente el desarrollo de tumores a partir de las células MDA-MB-231, pero los tumores resultantes no parecían privados de vasos sanguíneos (figura 2G-I).

Un cuadro diferente emerge cuando se examinaron los efectos de estas semaforinas sobre el desarrollo de tumores a partir de las células MD-MB-435 que expresan np2. Cuando las células de control se inyectan en las almohadillas de grasa de la mama de ratonas nu/nu balb/c, estas se desarrollan en pequeños tumores que dejan de crecer cuando alcanzan un volumen medio de 50 a 100 mm³ (figuras 3B, E y H). En cambio, no hay tal limitación sobre el desarrollo tumoral en ninguna de las otras líneas celulares procedentes de cáncer de mama utilizadas en este estudio. La expresión de la sema3F, agonista de np2, inhibió significativamente el desarrollo de tumores desde estas células (figuras 3B y C) y la sema3G, agonista de np2, era un inhibidor incluso más fuerte (figuras 3H-I). En cambio, la expresión de la sema3A, específica de np1, no inhibió el desarrollo de tumores desde estas células (figuras 3B-C) mientras que la sema3D, una semaforina que se fija a ambas neuropilinas, también inhibió significativamente su desarrollo, pero con menos fuerza que la sema3G (figuras 3E-F). Las células MDA-MB-435 también expresan PlexD1, el receptor de la sema3E, aunque en menos cantidad que la encontrada en las células MDA-MB-231 (figuras 1A-B). La expresión de la sema3E no inhibió la formación de tumores a partir de las células MDA-MB-435. Esto no se debía a la escisión por las proproteína convertasas de tipo furina, ya que estaba escindida menos del 5% de la sema3E hallada en el medio acondicionado de estas células (no se muestran los datos).

Los presentes inventores también determinaron cómo la expresión de la sema3A y la sema3F, los agonistas de np1 y np2 mejor estudiados, respectivamente, influye en el desarrollo de tumores a partir de las células MCF-7 dependientes de estrógenos y no metastásicas que expresan predominantemente np1. La expresión de la sema3A inhibió significativamente, aunque no completamente, el desarrollo de tumores desde estas células, mientras que la

sema3F no (figuras 4A-C). Estos efectos son similares a los observados con respecto al efecto de estas semaforinas sobre el desarrollo de tumores a partir de las células MDA-MB-231 (figuras 2A y 2C). En conjunto, estos resultados sugieren que la capacidad de las sema3 para inhibir la formación de tumores desde un tipo de células procedente de cáncer de mama depende de la identidad de los receptores de semaforinas que se expresan en las células del tumor en desarrollo, y además indica que las sema3 no deben ser capaces de inhibir la formación de tumores a partir de las células de cáncer de mama que no expresan los receptores de sema3.

Para comprobar esta predicción, se expresaron la sema3A y la sema3F en las células de cáncer de mama MDA-MB-468, que no expresan ni np1 ni np2 ni PlexD1 (figuras 1A, C). Estas células forman tumores de crecimiento lento tras la inyección en las almohadillas de grasa de la mam de ratonas nu/nu balb/c. De acuerdo con la presente predicción, ni la expresión de la sema3A ni la expresión de la sema3F inhibieron significativamente la formación de tumores a partir de estas células (figuras 4E-F).

Los efectos de diferentes semaforinas de clase 3 sobre la angiogénesis tumoral: la sema3F fue caracterizada en varios estudios como un inhibidor de la angiogénesis tumoral y como un factor repulsivo para las células endoteliales, y también se halló que la sema3A era un inhibidor de la angiogénesis inducida por el VEGF y también un factor repelente para las células endoteliales, aunque no era un inhibidor de la angiogénesis tumoral. Para comparar las propiedades repelentes de las diferentes semaforinas de clase 3, las células HEK293 que expresan una cantidad parecida de semaforinas se inocularon sobre monocapas de células endoteliales procedentes de la vena umbilical humana (HUVEC, por su nombre en inglés) en densidades clonales. Las células HEK293 secretaban una concentración parecida de semaforina en su medio de crecimiento, según se determinó mediante el análisis por transferencia Western con anticuerpos dirigidos contra la etiqueta del epítipo myc que se fusionó en fase delante del codón de parada de los ADNc de las diferentes semaforinas (no se muestran los datos). Las células de control infectadas con el vector lentivírico vacío no repelieron las células endoteliales, pero las células que expresaban la sema3A, la sema3D y la sema3E repelieron las células endoteliales con eficacia (figura 5A). No obstante, la sema3F, y en particular la sema3G, agonistas de np2, repelieron las HUVEC con menos fuerza que los agonistas de np1 o la sema3E, agonista de PlexD1 (no se muestran los datos). Por lo tanto, las células que expresan la sema3F o bien la sema3G se inocularon encima de células endoteliales aórticas de cerdo (PAE, por su nombre en inglés) manipuladas genéticamente para que expresen a la vez np2 y plexA1. Como se esperaba, estas células fueron repelidas con mucha fuerza por la sema3F, pero también fueron repelidas con menos eficacia por la sema3G (figura 5B).

Para encontrar si las diferentes sema3 que se examinaron en el presente ejemplo inhibían la angiogénesis tumoral, se determinó la concentración de los vasos sanguíneos en los tumores que se desarrollaron a partir del control y de las células procedentes de cáncer de mama que expresan semaforinas. Ya que la sema3A inhibía casi completamente la formación de tumores a partir de las células MDA-MB-231, no fue posible determinar la concentración de los vasos sanguíneos en este caso. Sin embargo, la expresión de la sema3D, agonista de np1, en este tipo celular dio lugar a la formación de tumores que contenían concentraciones significativamente más bajas de vasos sanguíneos que en los tumores que se desarrollaron a partir de las células de control (figura 5C). La reducción de la concentración de vasos sanguíneos asociados al tumor no se correlacionaba con los tipos de receptores de semaforinas que se expresaban en las células cancerosas ya que la expresión de la sema3F y de la sema3G, agonistas de np2, también redujo significativamente la concentración de vasos sanguíneos asociados al tumor en los tumores que se desarrollaron a partir de las células MDA-MB-231 (figura 5C). Se observó una reducción cuantitativa similar de la concentración de vasos sanguíneos asociados al tumor independientemente de si se utilizaba la sema3D o la sema3G, incluso aunque la expresión de la sema3D inhibiera la formación de tumores con eficacia mientras que la sema3G no inhibía la formación de tumores (figuras 2A-L). En cambio, la expresión de la sema3E, una semaforina que inhibía el desarrollo de tumores a partir de las células MDA-MB-231 (figuras 2G-I) y que inhibía la invasión de los vasos sanguíneos en los metámeros durante el desarrollo temprano, no dio lugar a una disminución de la concentración de vasos sanguíneos asociados a tumores en los tumores procedentes de MDA-MB-231 (figura 5C).

También se examinaron los efectos de la expresión de la sema3A y de la sema3F sobre la concentración de vasos sanguíneos asociados al tumor en las células MCF-7. Estos tumores se desarrollan en las almohadillas de grasa de la mama de las ratonas sólo en presencia de microgránulos de liberación lenta de estrógenos. La expresión de la sema3A en estas células redujo constante y significativamente la concentración de vasos sanguíneos asociados al tumor. Sin embargo, la expresión de la sema3F no (figura 5D).

En el caso de los tumores que se desarrollaron a partir de las células MDA-MB-435, se halló que la expresión de la sema3A y la sema3D reducía con fuerza la concentración de vasos sanguíneos en los tumores resultantes (figura 5E) incluso aunque el desarrollo de tumores desde estas células no estuviera inhibido por estas semaforinas (figuras 3A-I). No fue posible determinar la concentración de vasos sanguíneos en los tumores que se desarrollaron a partir de las células que expresan la sema3F o la sema3G ya que los tumores resultantes eran demasiado pequeños o inexistentes, como en el caso de la sema3G. La expresión de la sema3E produjo una disminución de la concentración de vasos sanguíneos en los tumores que se desarrollaban desde estas células, pero la disminución, aunque estadísticamente significativa, era pequeña.

En conjunto, estos experimentos indican que aunque la mayoría de las semaforinas serían capaces de inhibir la

angiogénesis, como se puso de manifiesto con la reducción de la concentración de vasos sanguíneos en los tumores, e incluso aunque la inhibición pueda contribuir a inhibir la progresión tumoral, no solía haber correlación entre esta capacidad y la inhibición del desarrollo tumoral que se correlacionaba principalmente con la expresión de los receptores de semaforinas adecuados en las células tumorales.

5 Los efectos de la expresión de diferentes semaforinas de clase 3 sobre el comportamiento de las células tumorales *in vitro*: los experimentos descritos más arriba en la presente memoria sugieren que la expresión de las semaforinas podría modular con fuerza el comportamiento de las células tumorales. De hecho, otros investigadores han descrito los efectos de las diferentes semaforinas de clase 3 sobre la adherencia, diseminación y proliferación de diferentes tipos de células tumorales [Tomizawa, Y. et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98: 13954-13959; Bielenberg, D. R et al., 2004, *J. Clin. Invest.* 114: 1260-1271; Nasarre, P. et al., 2005, *Neoplasia.* 7: 180-189]. No obstante, no se inhibió la proliferación de células MDA-MB-231 que expresaban la sema3A, o bien la sema3F, o bien la sema3D o bien la sema3E, en comparación con las células de control infectadas con los lentivirus que contenían el vector vacío. De igual forma, la proliferación de las células MCF-7 que expresaban la sema3A o bien la sema3F no se vio alterada en comparación con los controles, y las células MDA-MB-435 que expresaban la sema3A o la sema3F tampoco resultaron afectadas en comparación con las células de control (no se muestran los datos). Estos resultados indican que el efecto que estas semaforinas tienen sobre el crecimiento de tumores *in vivo* probablemente no está mediado por un efecto directo sobre la maquinaria de proliferación de las células tumorales. También se examinó el efecto de la expresión de las diferentes semaforinas sobre la adherencia de las diferentes células tumorales al plástico o a la fibronectina. Ni la expresión de la sema3A ni la de la sema3F influyó en la tasa o extensión de la adherencia de las células MDA-MB-231, MDA-MB-435 o MCF-7, independientemente de si el sustrato era plástico o fibronectina (no se muestran los datos).

La capacidad para formar colonias en agar blando es un distintivo que diferencia muchos tipos de células cancerosas de sus equivalentes normales. Por lo tanto, los presentes inventores determinaron si la expresión de diferentes semaforinas de clase 3 en las células MDA-MB-231 o MDA-MB-435 perturbaba su capacidad para formar colonias en agar blando. Ninguna de las semaforinas inhibió completamente la formación de colonias de células MDA-MB-231. Sin embargo, tanto la sema3A como la sema3D, semaforinas que inhiben con fuerza la formación de tumores desde estas células (figuras 2A-L), también inhibieron significativamente la formación de colonias grandes en agar blando (figuras 6A-B). Sorprendentemente, la sema3F también inhibió significativamente la formación de colonias grandes en agar blando a pesar de la ausencia de los receptores np2 en estas células. No obstante, la sema3F se fija a np1, aunque con una afinidad 10 veces más baja, y es posible que en este efecto inhibidor intervenga np1. Otro agonista de np2, la sema3G, que, a diferencia de la sema3F, no inhibe en absoluto el desarrollo de tumores a partir de las células MDA-MB-231 (figuras 2J-L) y que no se fija a np1, no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo de colonias en agar blando (figuras 6A-B). Estos resultados indicaron que la semaforina necesita fijarse al receptor de semaforinas expresado por las células tumorales para ser capaz de inhibir la formación de colonias en agar blando. Las células MDA-MB-231 también expresan PlexD1, el receptor de la sema3E, y la expresión de la sema3E inhibe la formación de tumores desde estas células (figuras 2G-I). Sin embargo, la sema3E no conseguía inhibir la formación de colonias grandes a partir de las células MDA-MB-231 en agar blando (figuras 6A-B).

Basándose en estos resultados, los presentes inventores predijeron que sema3D, sema3F y sema3G, que inhiben la formación de tumores a partir de las células MDA-MB-435 (figuras 3A-I), también deberían inhibir con eficacia la formación de colonias en agar blando a partir de estas células que expresan np2. De hecho, la sema3D y la sema3G inhibieron con eficacia la formación de colonias tal y como se predijo. Sin embargo, inesperadamente, se encontró que la sema3F inhibía la formación de colonias en agar blando desde estas células, incluso aunque no inhibiera la formación de tumores a partir de estas células (figuras 6C-D). Otra observación inesperada fue que la sema3E, que no inhibía la formación de tumores desde estas células, inhibió la formación de colonias (figura 6C-D). Finalmente, se esperaba que la sema3A no influyera en la formación de colonias, ya que su receptor no se expresa en las células MDA-MB-435 (figuras 10A-C). De hecho, la formación de colonias a partir de las células MDA-MB-435 no se vio inhibida por la sema3A. En su lugar, fue incluso estimulada (figuras 6C-D).

En conjunto, estos resultados sugieren que las diferentes semaforinas son capaces de modular directamente el comportamiento de las células MDA-MB-231 y MDA-MB-435, aunque había excepciones a esta regla.

La expresión de np1 en las células MDA-MB-435 estimula el desarrollo tumoral y la estimulación se anula con la coexpresión de la sema3A: los experimentos descritos más arriba sugieren que la expresión de determinados receptores de las semaforinas de clase 3 en las células tumorales procedentes de cáncer de mama es probablemente el factor más importante que determina si una semaforina de clase 3 dada será un inhibidor eficaz del desarrollo tumoral. Para comprobar esta hipótesis, los presentes inventores se preguntaron si la expresión de np1 en las células MDA-MB-435 convertiría los tumores que se desarrollarían de estas células en sensibles a la sema3A. Los tumores que se desarrollaron a partir de las células MDA-MB-435 que expresan np1 no dejaron de desarrollarse cuando alcanzaron un volumen medio de 50 a 100 mm³ como si ocurría con las células MDA-MB-435 de tipo silvestre (figuras 3A-I). Las células MDA-MB-435 que expresan np1 formaron rápidamente tumores en formación cuando se implantaron en las almohadillas de grasa de la mama de las ratonas (figuras 7A-C). Incluso aunque estas células que expresan np1 formaron tumores que estaban irrigados, la concentración de vasos sanguíneos dentro de estos tumores, según se determinó mediante tinción con un anticuerpo dirigido contra CD-31,

no era significativamente diferente de la de los tumores de control (figura 7D). Cuando la sema3A, agonista de np1, se coexpresaba en éstas con np1, las células que expresaban ambos genes revirtieron al comportamiento mostrado por las células originales y formaron tumores que dejaban de crecer cuando los tumores alcanzaban un volumen de 50 a 100 mm³, gracias a lo cual se elimina la ventaja de crecimiento conferida por la presencia de np1 (figuras 7A-C), pero no la conferida por la presencia de np2, que se puede inhibir con los agonistas de np2, tales como la sema3F o la sema3G (figuras 3A-I). El interesante señalar que la densidad de los vasos sanguíneos de los tumores que se desarrollaron a partir de las células MDA-MB-435 que expresan la sema3A o la sema3A + np1 era similar y significativamente más baja que la de los tumores que se desarrollaron a partir de las células MDA-MB-435 que no expresan la sema3A (figura 7D), lo que indica de nuevo que la inhibición de la angiogénesis representa parte del mecanismo mediante el cual las semaforinas modulan la progresión tumoral, pero que puede no ser siempre suficiente para inhibir la expansión tumoral.

Discusión

Los presentes resultados indican por primera vez que sema3A, sema3D, sema3E y sema3G inhiben la formación de tumores de diferentes líneas celulares procedentes de carcinomas de mama humanos. Debe destacarse que ya se había descrito que la sema3E era un agente prometastático, pero la actividad prometastática estaba asociada a un producto de escisión generado por las proproteína convertasas de tipo furina y no por la proteína completa. En los presentes experimentos no había casi ninguna escisión de la sema3E en las células MDA-MB-231 ni en las células MDA-MB-435.

Muchos tipos de células neoplásicas expresan uno o más de np1, np2 o PlexD1, los receptores de semaforinas de clase 3. Los tipos de células procedentes de cáncer de mama que se emplearon en los presentes ejemplos para estudiar los efectos antineoplásicos de las diferentes semaforinas expresan diferentes combinaciones de receptores de semaforinas de clase 3 en su superficie celular. Ambas neuropilinas, así como varios tipos de plexinas, también se expresan en las células endoteliales, en donde desempeñan una función importante en la transducción de las señales angiogénicas inducidas por el VEGF, y participan en los efectos antiangiogénicos de las sema3. En el presente estudio, los presentes inventores han intentado evaluar la importancia relativa de los efectos antiangiogénicos frente a los efectos directos de las sema3 a la hora de determinar las propiedades antineoplásicas de las diferentes sema3. En conjunto, los presentes ejemplos indican que la expresión de un determinado receptor de semaforinas en las células neoplásicas es probablemente el factor más importante que determina si una semaforina de clase 3 dada funcionará como un inhibidor eficaz del desarrollo tumoral. Así pues, el desarrollo de los tumores a partir de las células MDA-MB-231 que expresan np1, pero no np2, se ve fuertemente inhibido por la sema3A y la sema3D, agonistas de np1, pero no por la sema3G, agonista de np2. Esta conclusión también está respaldada por los experimentos que han demostrado que en el caso de las células MDA-MB-435 que expresan np2, la sema3A no inhibe el desarrollo tumoral y la sema3D inhibe débilmente el desarrollo tumoral, mientras que la sema3G y la sema3F funcionan como inhibidores muy eficaces en el caso de estas células. Además, ni la sema3A ni la sema3F fueron capaces de inhibir el desarrollo de tumores a partir de las células MDA-MB-468 que no expresan neuropilinas.

La sema3E es única entre las sema3 ya que es la única semaforina que no se fija a las neuropilinas y que, en cambio, activa directamente la PlexD1. Tanto las células MDA-MB-231 como las MDA-MB-435 expresan PlexD1, aunque el nivel de expresión en las células MDA-MB-435 es significativamente más bajo que en las células MDA-MB-231. La sema3E inhibió significativamente el desarrollo de tumores a partir de las células MDA-MB-231, pero no del todo a partir de las células MDA-MB-435. Es posible que el nivel de expresión de PlexD1 de las células MDA-MB-435 esté por debajo de un umbral crítico que no permite la inhibición del desarrollo de tumores debido a la sema3E. Así pues, este resultado quizás también se pueda considerar como uno que apoya el criterio general mencionado anteriormente. La PlexD1 puede formar complejos con las neuropilinas y, al menos en el caso de np1, esta interacción puede influir en la naturaleza de la respuesta biológica a la sema3E. Por lo tanto, es posible que, en las células MDA-MB-435, el efecto de la sema3E pueda estar inhibido por np2, mientras que, en las células MDA-MB-231, np1 puede influir en la señalización de la sema3E de manera diferente, y dar lugar a diversas respuestas biológicas.

Los presentes inventores demostraron por primera vez que sema3D, sema3G, sema3A y sema3E funcionan como inhibidores de la angiogénesis tumoral, ya que su expresión en las células tumorales dio lugar a una reducción significativa de la densidad de vasos sanguíneos asociados al tumor. Estos resultados indican que, por norma, la expresión de las semaforinas tiende a reducir la densidad de los vasos sanguíneos en los tumores que se desarrollan a partir de las células MDA-MB-231, MDA-MB-435 o MCF-7, incluso en el caso de que el desarrollo tumoral no se inhiba con la semaforina dada. Sin embargo, había unas pocas excepciones a esta regla. La densidad de los vasos sanguíneos en los tumores procedentes de las células MCF-7 que expresan la sema3F no se redujo en comparación con los tumores procedentes de las células MCF-7 de control. Sin embargo, el desarrollo de los tumores a partir de las células MCF-7 requiere estrógenos, unas hormonas que recientemente se encontró que inhiben la expresión de np2, el receptor de la sema3F, lo que puede explicar, quizás, la ausencia de efecto antiangiogénico en este caso. Además, se encontró que la expresión de la sema3E en las células MDA-MB-231 tampoco consiguió reducir la densidad de los vasos sanguíneos en los tumores resultantes, a pesar de la inhibición significativa del crecimiento tumoral.

La densidad de los vasos sanguíneos asociados a tumores viene determinada por un equilibrio entre la velocidad de la angiogénesis tumoral, que tiende a incrementar la densidad de los vasos sanguíneos, y la tasa de proliferación de las células tumorales, que tiende a disminuirla. Por lo tanto, es posible que un pequeño tumor cuya expansión se inhibió fuertemente mediante un agente antiangiogénico contenga la misma densidad de vasos sanguíneos que un tumor cuya expansión estaba mucho menos afectada por el agente antiangiogénico, simplemente porque en el último caso, la reducción de la densidad de los vasos sanguíneos no alcanzó el umbral por debajo del cual se inhibe la expansión de la masa tumoral. Se observó que, en la mayoría de los casos, la expresión de las semaforinas de clase 3 en las células tumorales reduce la densidad de los vasos sanguíneos en los tumores resultantes, independientemente de los tipos de receptores con los cuales interaccionan las semaforinas específicas, e independientemente de si las sema3 eran capaces de inhibir el desarrollo de los tumores. Por ejemplo, la sema3G disminuyó significativamente la densidad de los vasos sanguíneos en los tumores procedentes de las células MDA-MB-231 al igual que lo hacían la sema3D y la sema3F, incluso aunque, a diferencia de estas semaforinas, la sema3G no inhibiera el desarrollo tumoral.

Los presentes inventores razonaron que si la expresión de los receptores de semaforinas en las células tumorales es el factor principal que determina si las sema3 podrán inhibir el desarrollo tumoral, entonces la expresión de las semaforinas debe influir también en el comportamiento de tales células tumorales en los ensayos *in vitro*. Las semaforinas de clase 3 tales como la sema3F y la sema3B inhiben la adherencia y la migración de algunas células tumorales. Por lo tanto, fue sorprendente que ni la proliferación ni las propiedades de adherencia de las diferentes células tumorales utilizadas en este estudio se modificaran por la expresión de las diferentes semaforinas. Hasta ahora, la única propiedad de las células tumorales que se halló que estaba afectada por la expresión de las semaforinas fue su capacidad para formar colonias en agar blando. En general, las semaforinas que inhibieron la formación de los tumores a partir de las células MDA-MB-231 o bien de las células MDA-MB-435 también fueron capaces de inhibir el crecimiento independiente de anclaje de las células tumorales. El crecimiento independiente de anclaje es un distintivo de la mayoría de las células malignas y estas observaciones indican que las sema3 influyen directamente sobre una característica de las células tumorales que está correlacionada con sus propiedades malignas. Sin embargo, también se observaron unas pocas excepciones a esta regla. La expresión de la sema3E en las células MDA-MB-231 no inhibió el crecimiento sin anclaje de las células incluso aunque la formación de tumores de estas células estuviera inhibido. Se observó otra discrepancia en el caso de la sema3F, que cuando se expresó en las células MDA-MB-435 inhibió fuertemente la formación de tumores, pero no el crecimiento sin anclaje de estas células. La razón para estas discrepancias aún está investigándose, pero, no obstante, en general, hay una buena concordancia entre los efectos de las sema3 sobre el desarrollo de los tumores y su capacidad para inhibir el crecimiento sin anclaje.

En conclusión, los presentes inventores han hallado por primera vez que sema3A, sema3D, sema3E y sema3G poseen propiedades antineoplásicas similares a las mostradas por los supresores de tumores previamente identificados sema3F y sema3B. También se halló que todas estas semaforinas pueden repeler las células endoteliales con diferente potencia y que todas ellas son capaces de reducir significativamente la densidad de los vasos sanguíneos de los tumores que se desarrollan a partir de las células tumorales que expresan estas semaforinas. La sema3E era una excepción, ya que incluso aunque funcionara como un potente agente repelente para las células endoteliales *in vitro*, no tenía ningún efecto sobre la densidad de los vasos sanguíneos de los tumores que se desarrollaron a partir de las células MDA-MB-231, y sólo un pequeño efecto sobre la densidad de los vasos sanguíneos de los tumores que se desarrollan a partir de las células MDA-MB-435. Además, se observó que cada una de las semaforinas tenía una fuerte correlación entre la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* y la capacidad de inhibir el crecimiento independiente de anclaje *in vitro*. Estas observaciones condujeron a la conclusión de que las semaforinas permiten la inhibición eficaz del desarrollo tumoral cuando una semaforina concreta es capaz de inhibir directamente las propiedades malignas de las células tumorales y cuando esta semaforina también es capaz de inhibir con eficacia la angiogénesis tumoral. Los presentes resultados sostienen que las semaforinas se pueden usar como agentes antiangiogénicos generales. Sin embargo, para la máxima eficacia como agentes antineoplásicos, la selección de las semaforinas, o de las combinaciones de semaforinas, concretas tendrá que tener en cuenta la identidad de los receptores de semaforinas que se expresan en las células tumorales de los tumores deseados.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Rappaport Family Institute for Research in the Medical Sciences Neufeld, Gera Kigel, Boaz Kessler, Ofra Varshavsky, Asya

<120> COMPOSICIONES QUE COMPREDEN SEMAFORINAS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA ANGIOGÉNESIS

<130> P-78085-EP1

<150> US 60/960,910

<151> 19-10-2007

<150> US 61/006.496
 <151> 16-01-2008

5 <150> US 61/071.053
 <151> 10-04-2008

<150> US 61/071.560
 <151> 06-05-2008

10 <150> EP 08808106.2
 <151> 02-10-2008

<160> 40

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

25 <400> 1
ccacctaata atctgcaggc 20

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

35 <400> 2
gtgcatgaag gacagcctct 20

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

45 <400> 3
ttgcagtctc tgcctctcaa 20

50 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

<400> 4
gaaaaatgcg aatggctgat 20

60 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

 <400> 5
 5 **ccctgagggt gcagaagaag** 20

 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

 <400> 6
 15 **gtcccactgg agaactgcat** 20

 <210> 7
 <211> 20
 20 <212> DNA

 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

 <400> 7
ggttgagag gtccaccagg 20

 <210> 8
 <211> 20
 30 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

 <400> 8
 40 **ccgtggctgc ctatgactat** 20

 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

 <400> 9
 50 **catctcgtac tggacccac** 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

 <400> 10
 60 **ttacaacgg ctacagcgtg** 20

 <210> 11
 <211> 18

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

 <400> 11
accacgaagg cacggaag 18

 10 <210> 12
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

 <400> 12
agccagcggg gggacag 17
 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

 <400> 13
 30 **agcagtgcgc tcttaaccat 20**

 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

 <400> 14
 40 **caaaggccag agagtggctc 20**

 <210> 15
 <211> 19
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario
 50
 <400> 15
gagcagctcc acagtccag 19

 <210> 16
 55 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario
 60
 <400> 16
gtgctcgaca gcgtggt 17

<210> 17
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 17

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

Ala Pro Ala Gly Ala Phe Arg Asn Asp Lys Cys Gly Asp Thr Ile Lys
 20 25 30

Ile Glu Ser Pro Gly Tyr Leu Thr Ser Pro Gly Tyr Pro His Ser Tyr
 35 40 45

His Pro Ser Glu Lys Cys Glu Trp Leu Ile Gln Ala Pro Asp Pro Tyr
 50 55 60

Gln Arg Ile Met Ile Asn Phe Asn Pro His Phe Asp Leu Glu Asp Arg
 65 70 75 80

Asp Cys Lys Tyr Asp Tyr Val Glu Val Phe Asp Gly Glu Asn Glu Asn
 85 90 95

Gly His Phe Arg Gly Lys Phe Cys Gly Lys Ile Ala Pro Pro Pro Val
 100 105 110

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

Thr His Gly Ala Gly Phe Ser Ile Arg Tyr Glu Ile Phe Lys Arg Gly
 130 135 140

Pro Glu Cys Ser Gln Asn Tyr Thr Thr Pro Ser Gly Val Ile Lys Ser
 145 150 155 160

Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Pro Asn Ser Leu Glu Cys Thr Tyr Ile
 165 170 175

Val Phe Ala Pro Lys Met Ser Glu Ile Ile Leu Glu Phe Glu Ser Phe
 180 185 190

Asp Leu Glu Pro Asp Ser Asn Pro Pro Gly Gly Met Phe Cys Arg Tyr
 195 200 205

Asp Arg Leu Glu Ile Trp Asp Gly Phe Pro Asp Val Gly Pro His Ile
 210 215 220

Gly Arg Tyr Cys Gly Gln Lys Thr Pro Gly Arg Ile Arg Ser Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Ile Leu Ser Met Val Phe Tyr Thr Asp Ser Ala Ile Ala Lys Glu
 245 250 255

Gly Phe Ser Ala Asn Tyr Ser Val Leu Gln Ser Ser Val Ser Glu Asp
 260 265 270

Phe Lys Cys Met Glu Ala Leu Gly Met Glu Ser Gly Glu Ile His Ser
 275 280 285

Asp Gln Ile Thr Ala Ser Ser Gln Tyr Ser Thr Asn Trp Ser Ala Glu
 290 295 300

Arg Ser Arg Leu Asn Tyr Pro Glu Asn Gly Trp Thr Pro Gly Glu Asp
 305 310 315 320

Ser Tyr Arg Glu Trp Ile Gln Val Asp Leu Gly Leu Leu Arg Phe Val
 325 330 335

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

Tyr Tyr Val Lys Thr Tyr Lys Ile Asp Val Ser Ser Asn Gly Glu Asp
 355 360 365
 Trp Ile Thr Ile Lys Glu Gly Asn Lys Pro Val Leu Phe Gln Gly Asn
 370 375 380
 Thr Asn Pro Thr Asp Val Val Val Ala Val Phe Pro Lys Pro Leu Ile
 385 390 395 400
 Thr Arg Phe Val Arg Ile Lys Pro Ala Thr Trp Glu Thr Gly Ile Ser
 405 410 415
 Met Arg Phe Glu Val Tyr Gly Cys Lys Ile Thr Asp Tyr Pro Cys Ser
 420 425 430
 Gly Met Leu Gly Met Val Ser Gly Leu Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr
 435 440 445
 Ser Ser Asn Gln Gly Asp Arg Asn Trp Met Pro Glu Asn Ile Arg Leu
 450 455 460
 Val Thr Ser Arg Ser Gly Trp Ala Leu Pro Pro Ala Pro His Ser Tyr
 465 470 475 480
 Ile Asn Glu Trp Leu Gln Ile Asp Leu Gly Glu Glu Lys Ile Val Arg
 485 490 495
 Gly Ile Ile Ile Gln Gly Gly Lys His Arg Glu Asn Lys Val Phe Met
 500 505 510
 Arg Lys Phe Lys Ile Gly Tyr Ser Asn Asn Gly Ser Asp Trp Lys Met
 515 520 525
 Ile Met Asp Asp Ser Lys Arg Lys Ala Lys Ser Phe Glu Gly Asn Asn
 530 535 540
 Asn Tyr Asp Thr Pro Glu Leu Arg Thr Phe Pro Ala Leu Ser Thr Arg
 545 550 555 560
 Phe Ile Arg Ile Tyr Pro Glu Arg Ala Thr His Gly Gly Leu Gly Leu
 565 570 575
 Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ala Gly Pro
 580 585 590
 Thr Thr Pro Asn Gly Asn Leu Val Asp Glu Cys Asp Asp Asp Gln Ala
 595 600 605
 Asn Cys His Ser Gly Thr Gly Asp Asp Phe Gln Leu Thr Gly Gly Thr
 610 615 620
 Thr Val Leu Ala Thr Glu Lys Pro Thr Val Ile Asp Ser Thr Ile Gln
 625 630 635 640
 Ser Gly Ile Lys

<210> 18

<211> 909

5

ES 2 620 487 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

```

Met Asp Met Phe Pro Leu Thr Trp Val Phe Leu Ala Leu Tyr Phe Ser
1          5          10          15

Arg His Gln Val Arg Gly Gln Pro Asp Pro Pro Cys Gly Gly Arg Leu
          20          25          30

Asn Ser Lys Asp Ala Gly Tyr Ile Thr Ser Pro Gly Tyr Pro Gln Asp
          35          40          45

Tyr Pro Ser His Gln Asn Cys Glu Trp Ile Val Tyr Ala Pro Glu Pro
          50          55          60

Asn Gln Lys Ile Val Leu Asn Phe Asn Pro His Phe Glu Ile Glu Lys
          65          70          75          80

His Asp Cys Lys Tyr Asp Phe Ile Glu Ile Arg Asp Gly Asp Ser Glu
          85          90          95

Ser Ala Asp Leu Leu Gly Lys His Cys Gly Asn Ile Ala Pro Pro Thr
          100          105          110

Ile Ile Ser Ser Gly Ser Met Leu Tyr Ile Lys Phe Thr Ser Asp Tyr
          115          120          125

Ala Arg Gln Gly Ala Gly Phe Ser Leu Arg Tyr Glu Ile Phe Lys Thr
          130          135          140

Gly Ser Glu Asp Cys Ser Lys Asn Phe Thr Ser Pro Asn Gly Thr Ile
          145          150          155          160

Glu Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Pro His Asn Leu Asp Cys Thr
          165          170          175
  
```

5

Phe Thr Ile Leu Ala Lys Pro Lys Met Glu Ile Ile Leu Gln Phe Leu
 180 185 190

Ile Phe Asp Leu Glu His Asp Pro Leu Gln Val Gly Glu Gly Asp Cys
 195 200 205

Lys Tyr Asp Trp Leu Asp Ile Trp Asp Gly Ile Pro His Val Gly Pro
 210 215 220

Leu Ile Gly Lys Tyr Cys Gly Thr Lys Thr Pro Ser Glu Leu Arg Ser
 225 230 235 240

Ser Thr Gly Ile Leu Ser Leu Thr Phe His Thr Asp Met Ala Val Ala
 245 250 255

Lys Asp Gly Phe Ser Ala Arg Tyr Tyr Leu Val His Gln Glu Pro Leu
 260 265 270

Glu Asn Phe Gln Cys Asn Val Pro Leu Gly Met Glu Ser Gly Arg Ile
 275 280 285

Ala Asn Glu Gln Ile Ser Ala Ser Ser Thr Tyr Ser Asp Gly Arg Trp
 290 295 300

Thr Pro Gln Gln Ser Arg Leu His Gly Asp Asp Asn Gly Trp Thr Pro
 305 310 315 320

Asn Leu Asp Ser Asn Lys Glu Tyr Leu Gln Val Asp Leu Arg Phe Leu
 325 330 335

Thr Met Leu Thr Ala Ile Ala Thr Gln Gly Ala Ile Ser Arg Glu Thr
 340 345 350

Gln Asn Gly Tyr Tyr Val Lys Ser Tyr Lys Leu Glu Val Ser Thr Asn
 355 360 365

Gly Glu Asp Trp Met Val Tyr Arg His Gly Lys Asn His Lys Val Phe
 370 375 380

Gln Ala Asn Asn Asp Ala Thr Glu Val Val Leu Asn Lys Leu His Ala
 385 390 395 400

Pro Leu Leu Thr Arg Phe Val Arg Ile Arg Pro Gln Thr Trp His Ser
 405 410 415

Gly Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu Phe Gly Cys Arg Val Thr Asp Ala

ES 2 620 487 T3

Ser Ser Pro Asn Asp Arg Thr Phe Pro Asp Asp Arg Asn Phe Leu Arg
675 680 685

Leu Gln Ser Asp Ser Gln Arg Glu Gly Gln Tyr Ala Arg Leu Ile Ser
690 695 700

Pro Pro Val His Leu Pro Arg Ser Pro Val Cys Met Glu Phe Gln Tyr
705 710 715 720

Gln Ala Thr Gly Gly Arg Gly Val Ala Leu Gln Val Val Arg Glu Ala
725 730 735

Ser Gln Glu Ser Lys Leu Leu Trp Val Ile Arg Glu Asp Gln Gly Gly
740 745 750

Glu Trp Lys His Gly Arg Ile Ile Leu Pro Ser Tyr Asp Met Glu Tyr
755 760 765

Gln Ile Val Phe Glu Gly Val Ile Gly Lys Gly Arg Ser Gly Glu Ile
770 775 780

Ala Ile Asp Asp Ile Arg Ile Ser Thr Asp Val Pro Leu Glu Asn Cys
785 790 795 800

Met Glu Pro Ile Ser Ala Phe Ala Asp Glu Tyr Glu Val Asp Trp Ser
805 810 815

Asn Ser Ser Ser Ala Thr Ser Gly Ser Gly Ala Pro Ser Thr Asp Lys
820 825 830

Glu Lys Ser Trp Leu Tyr Thr Leu Asp Pro Ile Leu Ile Thr Ile Ile
835 840 845

Ala Met Ser Ser Leu Gly Val Leu Leu Gly Ala Thr Cys Ala Gly Leu
850 855 860

Leu Leu Tyr Cys Thr Cys Ser Tyr Ser Gly Leu Ser Ser Arg Ser Cys
865 870 875 880

Thr Thr Leu Glu Asn Tyr Asn Phe Glu Leu Tyr Asp Gly Leu Lys His
885 890 895

Lys Val Lys Met Asn His Gln Lys Cys Cys Ser Glu Ala
900 905

<210> 19
<211> 1873
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

ES 2 620 487 T3

<400> 19

Met Trp Ala Glu Ala Gly Leu Pro Arg Ala Gly Gly Gly Ser Gln Pro
1 5 10 15

Pro Phe Arg Thr Phe Ser Ala Ser Asp Trp Gly Leu Thr His Leu Val
20 25 30

Val His Glu Gln Thr Gly Glu Val Tyr Val Gly Ala Val Asn Arg Ile
35 40 45

Tyr Lys Leu Ser Gly Asn Leu Thr Leu Leu Arg Ala His Val Thr Gly

ES 2 620 487 T3

Phe Thr Leu Arg Ala Ile Lys Glu Lys Ile Lys Glu Arg Ile Gln Ser
 340 345 350
 Cys Tyr Arg Gly Glu Gly Lys Leu Ser Leu Pro Trp Leu Leu Asn Lys
 355 360 365
 Glu Leu Gly Cys Ile Asn Ser Pro Leu Gln Ile Asp Asp Asp Phe Cys
 370 375 380
 Gly Gln Asp Phe Asn Gln Pro Leu Gly Gly Thr Val Thr Ile Glu Gly
 385 390 395 400
 Thr Pro Leu Phe Val Asp Lys Asp Asp Gly Leu Thr Ala Val Ala Ala
 405 410 415
 Tyr Asp Tyr Arg Gly Arg Thr Val Val Phe Ala Gly Thr Arg Ser Gly
 420 425 430
 Arg Ile Arg Lys Ile Leu Val Asp Leu Ser Asn Pro Gly Gly Arg Pro
 435 440 445
 Ala Leu Ala Tyr Glu Ser Val Val Ala Gln Glu Gly Ser Pro Ile Leu
 450 455 460
 Arg Asp Leu Val Leu Ser Pro Asn His Gln Tyr Leu Tyr Ala Met Thr
 465 470 475 480
 Glu Lys Gln Val Thr Arg Val Pro Val Glu Ser Cys Val Gln Tyr Thr
 485 490 495
 Ser Cys Glu Leu Cys Leu Gly Ser Arg Asp Pro His Cys Gly Trp Cys
 500 505 510
 Val Leu His Ser Ile Cys Ser Arg Arg Asp Ala Cys Glu Arg Ala Asp
 515 520 525
 Glu Pro Gln Arg Phe Ala Ala Asp Leu Leu Gln Cys Val Gln Leu Thr
 530 535 540
 Val Gln Pro Arg Asn Val Ser Val Thr Met Ser Gln Val Pro Leu Val
 545 550 555 560
 Leu Gln Ala Trp Asn Val Pro Asp Leu Ser Ala Gly Val Asn Cys Ser
 565 570 575
 Phe Glu Asp Phe Thr Glu Ser Glu Ser Val Leu Glu Asp Gly Arg Ile
 580 585 590
 His Cys Arg Ser Pro Ser Ala Arg Glu Val Ala Pro Ile Thr Arg Gly
 595 600 605
 Gln Gly Asp Gln Arg Val Val Lys Leu Tyr Leu Lys Ser Lys Glu Thr
 610 615 620

ES 2 620 487 T3

Gly Lys Lys Phe Ala Ser Val Asp Phe Val Phe Tyr Asn Cys Ser Val
625 630 635 640

His Gln Ser Cys Leu Ser Cys Val Asn Gly Ser Phe Pro Cys His Trp
645 650 655

Cys Lys Tyr Arg His Val Cys Thr His Asn Val Ala Asp Cys Ala Phe
660 665 670

Leu Glu Gly Arg Val Asn Val Ser Glu Asp Cys Pro Gln Ile Leu Pro
675 680 685

Ser Thr Gln Ile Tyr Val Pro Val Gly Val Val Lys Pro Ile Thr Leu
690 695 700

Ala Ala Arg Asn Leu Pro Gln Pro Gln Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Glu
705 710 715 720

Cys Leu Phe His Ile Pro Gly Ser Pro Ala Arg Val Thr Ala Leu Arg
725 730 735

Phe Asn Ser Ser Ser Leu Gln Cys Gln Asn Ser Ser Tyr Ser Tyr Glu
740 745 750

Gly Asn Asp Val Ser Asp Leu Pro Val Asn Leu Ser Val Val Trp Asn
755 760 765

Gly Asn Phe Val Ile Asp Asn Pro Gln Asn Ile Gln Ala His Leu Tyr
770 775 780

Lys Cys Pro Ala Leu Arg Glu Ser Cys Gly Leu Cys Leu Lys Ala Asp
785 790 795 800

Pro Arg Phe Glu Cys Gly Trp Cys Val Ala Glu Arg Arg Cys Ser Leu
805 810 815

Arg His His Cys Ala Ala Asp Thr Pro Ala Ser Trp Met His Ala Arg
820 825 830

His Gly Ser Ser Arg Cys Thr Asp Pro Lys Ile Leu Lys Leu Ser Pro
835 840 845

Glu Thr Gly Pro Arg Gln Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Thr Gly Glu
850 855 860

Asn Leu Gly Leu Arg Phe Glu Asp Val Arg Leu Gly Val Arg Val Gly
865 870 875 880

Lys Val Leu Cys Ser Pro Val Glu Ser Glu Tyr Ile Ser Ala Glu Gln
885 890 895

Ile Val Cys Glu Ile Gly Asp Ala Ser Ser Val Arg Ala His Asp Ala
900 905 910

ES 2 620 487 T3

Leu Val Glu Val Cys Val Arg Asp Cys Ser Pro His Tyr Arg Ala Leu
 915 920 925

Ser Pro Lys Arg Phe Thr Phe Val Thr Pro Thr Phe Tyr Arg Val Ser
 930 935 940

Pro Ser Arg Gly Pro Leu Ser Gly Gly Thr Trp Ile Gly Ile Glu Gly
 945 950 955 960

Ser His Leu Asn Ala Gly Ser Asp Val Ala Val Ser Val Gly Gly Arg
 965 970 975

Pro Cys Ser Phe Ser Trp Arg Asn Ser Arg Glu Ile Arg Cys Leu Thr
 980 985 990

Pro Pro Gly Gln Ser Pro Gly Ser Ala Pro Ile Ile Ile Asn Ile Asn
 995 1000 1005

Arg Ala Gln Leu Thr Asn Pro Glu Val Lys Tyr Asn Tyr Thr Glu
 1010 1015 1020

Asp Pro Thr Ile Leu Arg Ile Asp Pro Glu Trp Ser Ile Asn Ser
 1025 1030 1035

Gly Gly Thr Leu Leu Thr Val Thr Gly Thr Asn Leu Ala Thr Val
 1040 1045 1050

Arg Glu Pro Arg Ile Arg Ala Lys Tyr Gly Gly Ile Glu Arg Glu
 1055 1060 1065

Asn Gly Cys Leu Val Tyr Asn Asp Thr Thr Met Val Cys Arg Ala
 1070 1075 1080

Pro Ser Val Ala Asn Pro Val Arg Ser Pro Pro Glu Leu Gly Glu
 1085 1090 1095

Arg Pro Asp Glu Leu Gly Phe Val Met Asp Asn Val Arg Ser Leu
 1100 1105 1110

Leu Val Leu Asn Ser Thr Ser Phe Leu Tyr Tyr Pro Asp Pro Val
 1115 1120 1125

Leu Glu Pro Leu Ser Pro Thr Gly Leu Leu Glu Leu Lys Pro Ser
 1130 1135 1140

Ser Pro Leu Ile Leu Lys Gly Arg Asn Leu Leu Pro Pro Ala Pro
 1145 1150 1155

Gly Asn Ser Arg Leu Asn Tyr Thr Val Leu Ile Gly Ser Thr Pro
 1160 1165 1170

Cys Thr Leu Thr Val Ser Glu Thr Gln Leu Leu Cys Glu Ala Pro

ES 2 620 487 T3

1175						1180										1185
Asn	Leu	Thr	Gly	Gln	His	Lys	Val	Thr	Val	Arg	Ala	Gly	Gly	Phe		
1190						1195					1200					
Glu	Phe	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Gln	Val	Tyr	Ser	Asp	Ser	Leu	Leu		
1205						1210					1215					
Thr	Leu	Pro	Ala	Ile	Val	Gly	Ile	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu		
1220						1225					1230					
Leu	Leu	Val	Ile	Val	Ala	Val	Leu	Ile	Ala	Tyr	Lys	Arg	Lys	Ser		
1235						1240					1245					
Arg	Asp	Ala	Asp	Arg	Thr	Leu	Lys	Arg	Leu	Gln	Leu	Gln	Met	Asp		
1250						1255					1260					
Asn	Leu	Glu	Ser	Arg	Val	Ala	Leu	Glu	Cys	Lys	Glu	Ala	Phe	Ala		
1265						1270					1275					
Glu	Leu	Gln	Thr	Asp	Ile	His	Glu	Leu	Thr	Asn	Asp	Leu	Asp	Gly		
1280						1285					1290					
Ala	Gly	Ile	Pro	Phe	Leu	Asp	Tyr	Arg	Thr	Tyr	Ala	Met	Arg	Val		
1295						1300					1305					
Leu	Phe	Pro	Gly	Ile	Glu	Asp	His	Pro	Val	Leu	Lys	Glu	Met	Glu		
1310						1315					1320					
Val	Gln	Ala	Asn	Val	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Gln	Leu		
1325						1330					1335					
Leu	Thr	Lys	Lys	His	Phe	Leu	Leu	Thr	Phe	Ile	Arg	Thr	Leu	Glu		
1340						1345					1350					
Ala	Gln	Arg	Ser	Phe	Ser	Met	Arg	Asp	Arg	Gly	Asn	Val	Ala	Ser		
1355						1360					1365					
Leu	Ile	Met	Thr	Ala	Leu	Gln	Gly	Glu	Met	Glu	Tyr	Ala	Thr	Gly		
1370						1375					1380					
Val	Leu	Lys	Gln	Leu	Leu	Ser	Asp	Leu	Ile	Glu	Lys	Asn	Leu	Glu		
1385						1390					1395					
Ser	Lys	Asn	His	Pro	Lys	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Thr	Glu	Ser	Val		
1400						1405					1410					
Ala	Glu	Lys	Met	Leu	Thr	Asn	Trp	Phe	Thr	Phe	Leu	Leu	Tyr	Lys		
1415						1420					1425					
Phe	Leu	Lys	Glu	Cys	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Phe	Met	Leu	Tyr	Cys		
1430						1435					1440					

ES 2 620 487 T3

Ala Ile Lys Gln Gln Met Glu Lys Gly Pro Ile Asp Ala Ile Thr
 1445 1450 1455

Gly Glu Ala Arg Tyr Ser Leu Ser Glu Asp Lys Leu Ile Arg Gln
 1460 1465 1470

Gln Ile Asp Tyr Lys Thr Leu Thr Leu Asn Cys Val Asn Pro Glu
 1475 1480 1485

Asn Glu Asn Ala Pro Glu Val Pro Val Lys Gly Leu Asp Cys Asp
 1490 1495 1500

Thr Val Thr Gln Ala Lys Glu Lys Leu Leu Asp Ala Ala Tyr Lys
 1505 1510 1515

Gly Val Pro Tyr Ser Gln Arg Pro Lys Ala Ala Asp Met Asp Leu
 1520 1525 1530

Glu Trp Arg Gln Gly Arg Met Ala Arg Ile Ile Leu Gln Asp Glu
 1535 1540 1545

Asp Val Thr Thr Lys Ile Asp Asn Asp Trp Lys Arg Leu Asn Thr
 1550 1555 1560

Leu Ala His Tyr Gln Val Thr Asp Gly Ser Ser Val Ala Leu Val
 1565 1570 1575

Pro Lys Gln Thr Ser Ala Tyr Asn Ile Ser Asn Ser Ser Thr Phe
 1580 1585 1590

Thr Lys Ser Leu Ser Arg Tyr Glu Ser Met Leu Arg Thr Ala Ser
 1595 1600 1605

Ser Pro Asp Ser Leu Arg Ser Arg Thr Pro Met Ile Thr Pro Asp
 1610 1615 1620

Leu Glu Ser Gly Thr Lys Leu Trp His Leu Val Lys Asn His Asp
 1625 1630 1635

His Leu Asp Gln Arg Glu Gly Asp Arg Gly Ser Lys Met Val Ser
 1640 1645 1650

Glu Ile Tyr Leu Thr Arg Leu Leu Ala Thr Lys Gly Thr Leu Gln
 1655 1660 1665

Lys Phe Val Asp Asp Leu Phe Glu Thr Ile Phe Ser Thr Ala His
 1670 1675 1680

Arg Gly Ser Ala Leu Pro Leu Ala Ile Lys Tyr Met Phe Asp Phe
 1685 1690 1695

Leu Asp Glu Gln Ala Asp Lys His Gln Ile His Asp Ala Asp Val
 1700 1705 1710

ES 2 620 487 T3

Arg His Thr Trp Lys Ser Asn Cys Leu Pro Leu Arg Phe Trp Val
 1715 1720 1725

Asn Val Ile Lys Asn Pro Gln Phe Val Phe Asp Ile His Lys Asn
 1730 1735 1740

Ser Ile Thr Asp Ala Cys Leu Ser Val Val Ala Gln Thr Phe Met
 1745 1750 1755

Asp Ser Cys Ser Thr Ser Glu His Lys Leu Gly Lys Asp Ser Pro
 1760 1765 1770

Ser Asn Lys Leu Leu Tyr Ala Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Lys Ser
 1775 1780 1785

Trp Val Glu Arg Tyr Tyr Ala Asp Ile Ala Lys Met Pro Ala Ile
 1790 1795 1800

Ser Asp Gln Asp Met Ser Ala Tyr Leu Ala Glu Gln Ser Arg Leu
 1805 1810 1815

His Leu Ser Gln Phe Asn Ser Met Ser Ala Leu His Glu Ile Tyr
 1820 1825 1830

Ser Tyr Ile Thr Lys Tyr Lys Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Glu
 1835 1840 1845

Lys Asp Glu Gln Ala Arg Arg Gln Arg Leu Arg Ser Lys Leu Glu
 1850 1855 1860

Gln Val Val Asp Thr Met Ala Leu Ser Ser
 1865 1870

<210> 20
 <211> 1894
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Met Glu Gln Arg Arg Pro Trp Pro Arg Ala Leu Glu Val Asp Ser Arg
 1 5 10 15

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

Ala Gly Met Pro Gln Phe Ser Thr Phe His Ser Glu Asn Arg Asp Trp
 35 40 45

Thr Phe Asn His Leu Thr Val His Gln Gly Thr Gly Ala Val Tyr Val
 50 55 60

Gly Ala Ile Asn Arg Val Tyr Lys Leu Thr Gly Asn Leu Thr Ile Gln
 65 70 75 80

10

ES 2 620 487 T3

Val Ala His Lys Thr Gly Pro Glu Glu Asp Asn Lys Ser Cys Tyr Pro
85 90 95

Pro Leu Ile Val Gln Pro Cys Ser Glu Val Leu Thr Leu Thr Asn Asn
100 105 110

Val Asn Lys Leu Leu Ile Ile Asp Tyr Ser Glu Asn Arg Leu Leu Ala
115 120 125

Cys Gly Ser Leu Tyr Gln Gly Val Cys Lys Leu Leu Arg Leu Asp Asp
130 135 140

Leu Phe Ile Leu Val Glu Pro Ser His Lys Lys Glu His Tyr Leu Ser
145 150 155 160

Ser Val Asn Lys Thr Gly Thr Met Tyr Gly Val Ile Val Arg Ser Glu
165 170 175

Gly Glu Asp Gly Lys Leu Phe Ile Gly Thr Ala Val Asp Gly Lys Gln
180 185 190

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

Ser Ser Ala Met Leu Asp Tyr Glu Leu His Ser Asp Phe Val Ser Ser
210 215 220

Leu Ile Lys Ile Pro Ser Asp Thr Leu Ala Leu Val Ser His Phe Asp
225 230 235 240

Ile Phe Tyr Ile Tyr Gly Phe Ala Ser Gly Gly Phe Val Tyr Phe Leu
245 250 255

Thr Val Gln Pro Glu Thr Pro Glu Gly Val Ala Ile Asn Ser Ala Gly
260 265 270

Asp Leu Phe Tyr Thr Ser Arg Ile Val Arg Leu Cys Lys Asp Asp Pro
275 280 285

Lys Phe His Ser Tyr Val Ser Leu Pro Phe Gly Cys Thr Arg Ala Gly
290 295 300

Val Glu Tyr Arg Leu Leu Gln Ala Ala Tyr Leu Ala Lys Pro Gly Asp
305 310 315 320

Ser Leu Ala Gln Ala Phe Asn Ile Thr Ser Gln Asp Asp Val Leu Phe
325 330 335

Ala Ile Phe Ser Lys Gly Gln Lys Gln Tyr His His Pro Pro Asp Asp
340 345 350

Ser Ala Leu Cys Ala Phe Pro Ile Arg Ala Ile Asn Leu Gln Ile Lys
355 360 365

ES 2 620 487 T3

Glu Arg Leu Gln Ser Cys Tyr Gln Gly Glu Gly Asn Leu Glu Leu Asn
 370 375 380
 Trp Leu Leu Gly Lys Asp Val Gln Cys Thr Lys Ala Pro Val Pro Ile
 385 390 395 400
 Asp Asp Asn Phe Cys Gly Leu Asp Ile Asn Gln Pro Leu Gly Gly Ser
 405 410 415
 Thr Pro Val Glu Gly Leu Thr Leu Tyr Thr Thr Ser Arg Asp Arg Met
 420 425 430
 Thr Ser Val Ala Ser Tyr Val Tyr Asn Gly Tyr Ser Val Val Phe Val
 435 440 445
 Gly Thr Lys Ser Gly Lys Leu Lys Lys Ile Arg Ala Asp Gly Pro Pro
 450 455 460
 His Gly Gly Val Gln Tyr Glu Met Val Ser Val Leu Lys Asp Gly Ser
 465 470 475 480
 Pro Ile Leu Arg Asp Met Ala Phe Ser Ile Asp Gln Arg Tyr Leu Tyr
 485 490 495
 Val Met Ser Glu Arg Gln Val Thr Arg Val Pro Val Glu Ser Cys Glu
 500 505 510
 Gln Tyr Thr Thr Cys Gly Glu Cys Leu Ser Ser Gly Asp Pro His Cys
 515 520 525
 Gly Trp Cys Ala Leu His Asn Met Cys Ser Arg Arg Asp Lys Cys Gln
 530 535 540
 Gln Ala Trp Glu Pro Asn Arg Phe Ala Ala Ser Ile Ser Gln Cys Val
 545 550 555 560
 Ser Leu Ala Val His Pro Ser Ser Ile Ser Val Ser Glu His Ser Arg
 565 570 575
 Leu Leu Ser Leu Val Val Ser Asp Ala Pro Asp Leu Ser Ala Gly Ile
 580 585 590
 Ala Cys Ala Phe Gly Asn Leu Thr Glu Val Glu Gly Gln Val Ser Gly
 595 600 605
 Ser Gln Val Ile Cys Ile Ser Pro Gly Pro Lys Asp Val Pro Val Ile
 610 615 620
 Pro Leu Asp Gln Asp Trp Phe Gly Leu Glu Leu Gln Leu Arg Ser Lys
 625 630 635 640
 Glu Thr Gly Lys Ile Phe Val Ser Thr Glu Phe Lys Phe Tyr Asn Cys

ES 2 620 487 T3

Pro Val Arg Leu Cys Ile Gly Glu Cys Lys Pro Glu Phe Met Thr Lys
 930 935 940
 Ser His Gln Gln Tyr Thr Phe Val Asn Pro Ser Val Leu Ser Leu Asn
 945 950 955 960
 Pro Ile Arg Gly Pro Glu Ser Gly Gly Thr Met Val Thr Ile Thr Gly
 965 970 975
 His Tyr Leu Gly Ala Gly Ser Ser Val Ala Val Tyr Leu Gly Asn Gln
 980 985 990
 Thr Cys Glu Phe Tyr Gly Arg Ser Met Ser Glu Ile Val Cys Val Ser
 995 1000 1005
 Pro Pro Ser Ser Asn Gly Leu Gly Pro Val Pro Val Ser Val Ser
 1010 1015 1020
 Val Asp Arg Ala His Val Asp Ser Asn Leu Gln Phe Glu Tyr Ile
 1025 1030 1035
 Asp Asp Pro Arg Val Gln Arg Ile Glu Pro Glu Trp Ser Ile Ala
 1040 1045 - 1050
 Ser Gly His Thr Pro Leu Thr Ile Thr Gly Phe Asn Leu Asp Val
 1055 1060 1065
 Ile Gln Glu Pro Arg Ile Arg Val Lys Phe Asn Gly Lys Glu Ser
 1070 1075 1080
 Val Asn Val Cys Lys Val Val Asn Thr Thr Thr Leu Thr Cys Leu
 1085 1090 1095
 Ala Pro Ser Leu Thr Thr Asp Tyr Arg Pro Gly Leu Asp Thr Val
 1100 1105 1110
 Glu Arg Pro Asp Glu Phe Gly Phe Val Phe Asn Asn Val Gln Ser
 1115 1120 1125
 Leu Leu Ile Tyr Asn Asp Thr Lys Phe Ile Tyr Tyr Pro Asn Pro
 1130 1135 1140
 Thr Phe Glu Leu Leu Ser Pro Thr Gly Val Leu Asp Gln Lys Pro
 1145 1150 1155
 Gly Ser Pro Ile Ile Leu Lys Gly Lys Asn Leu Cys Pro Pro Ala
 1160 1165 1170
 Ser Gly Gly Ala Lys Leu Asn Tyr Thr Val Leu Ile Gly Glu Thr
 1175 1180 1185
 Pro Cys Ala Val Thr Val Ser Glu Thr Gln Leu Leu Cys Glu Pro
 1190 1195 1200

ES 2 620 487 T3

Pro Asn Leu Thr Gly Gln His Lys Val Met Val His Val Gly Gly
 1205 1210 1215

 Met Val Phe Ser Pro Gly Ser Val Ser Val Ile Ser Asp Ser Leu
 1220 1225 1230

 Leu Thr Leu Pro Ala Ile Val Ser Ile Ala Ala Gly Gly Ser Leu
 1235 1240 1245

 Leu Leu Ile Ile Val Ile Ile Val Leu Ile Ala Tyr Lys Arg Lys
 1250 1255 1260

 Ser Arg Glu Asn Asp Leu Thr Leu Lys Arg Leu Gln Met Gln Met
 1265 1270 1275

 Asp Asn Leu Glu Ser Arg Val Ala Leu Glu Cys Lys Glu Ala Phe
 1280 1285 1290

 Ala Glu Leu Gln Thr Asp Ile Asn Glu Leu Thr Ser Asp Leu Asp
 1295 1300 1305

 Arg Ser Gly Ile Pro Tyr Leu Asp Tyr Arg Thr Tyr Ala Met Arg
 1310 1315 1320

 Val Leu Phe Pro Gly Ile Glu Asp His Pro Val Leu Arg Glu Leu
 1325 1330 1335

 Glu Val Gln Gly Asn Gly Gln Gln His Val Glu Lys Ala Leu Lys
 1340 1345 1350

 Leu Phe Ala Gln Leu Ile Asn Asn Lys Val Phe Leu Leu Thr Phe
 1355 1360 1365

 Ile Arg Thr Leu Glu Leu Gln Arg Ser Phe Ser Met Arg Asp Arg
 1370 1375 1380

 Gly Asn Val Ala Ser Leu Ile Met Thr Gly Leu Gln Gly Arg Leu
 1385 1390 1395

 Glu Tyr Ala Thr Asp Val Leu Lys Gln Leu Leu Ser Asp Leu Ile
 1400 1405 1410

 Asp Lys Asn Leu Glu Asn Lys Asn His Pro Lys Leu Leu Leu Arg
 1415 1420 1425

 Arg Thr Glu Ser Val Ala Glu Lys Met Leu Thr Asn Trp Phe Ala
 1430 1435 1440

 Phe Leu Leu His Lys Phe Leu Lys Glu Cys Ala Gly Glu Pro Leu
 1445 1450 1455

 Phe Met Leu Tyr Cys Ala Ile Lys Gln Gln Met Glu Lys Gly Pro
 1460 1465 1470

ES 2 620 487 T3

Ile Asp Ala Ile Thr Gly Glu Ala Arg Tyr Ser Leu Ser Glu Asp
1475 1480 1485

Lys Leu Ile Arg Gln Gln Ile Glu Tyr Lys Thr Leu Ile Leu Asn
1490 1495 1500

Cys Val Asn Pro Asp Asn Glu Asn Ser Pro Glu Ile Pro Val Lys
1505 1510 1515

Val Leu Asn Cys Asp Thr Ile Thr Gln Val Lys Glu Lys Ile Leu
1520 1525 1530

Asp Ala Val Tyr Lys Asn Val Pro Tyr Ser Gln Arg Pro Arg Ala
1535 1540 1545

Val Asp Met Asp Leu Glu Trp Arg Gln Gly Arg Ile Ala Arg Val
1550 1555 1560

Val Leu Gln Asp Glu Asp Ile Thr Thr Lys Ile Glu Gly Asp Trp
1565 1570 1575

Lys Arg Leu Asn Thr Leu Met His Tyr Gln Val Ser Asp Arg Ser
1580 1585 1590

Val Val Ala Leu Val Pro Lys Gln Thr Ser Ser Tyr Asn Ile Pro
1595 1600 1605

Ala Ser Ala Ser Ile Ser Arg Thr Ser Ile Ser Arg Tyr Asp Ser
1610 1615 1620

Ser Phe Arg Tyr Thr Gly Ser Pro Asp Ser Leu Arg Ser Arg Ala
1625 1630 1635

Pro Met Ile Thr Pro Asp Leu Glu Ser Gly Val Lys Val Trp His
1640 1645 1650

Leu Val Lys Asn His Asp His Gly Asp Gln Lys Glu Gly Asp Arg
1655 1660 1665

Gly Ser Lys Met Val Ser Glu Ile Tyr Leu Thr Arg Leu Leu Ala
1670 1675 1680

Thr Lys Gly Thr Leu Gln Lys Phe Val Asp Asp Leu Phe Glu Thr
1685 1690 1695

Leu Phe Ser Thr Val His Arg Gly Ser Ala Leu Pro Leu Ala Ile
1700 1705 1710

Lys Tyr Met Phe Asp Phe Leu Asp Glu Gln Ala Asp Arg His Ser
1715 1720 1725

Ile His Asp Thr Asp Val Arg His Thr Trp Lys Ser Asn Cys Leu

ES 2 620 487 T3

Ile Gln Ser Cys Tyr Arg Gly Glu Gly Thr Leu Ala Leu Pro Trp Leu
 355 360 365

Leu Asn Lys Glu Leu Pro Cys Ile Asn Thr Pro Met Gln Ile Asn Gly
 370 375 380

Asn Phe Cys Gly Leu Val Leu Asn Gln Pro Leu Gly Gly Leu His Val
 385 390 395 400

Ile Glu Gly Leu Pro Leu Leu Ala Asp Ser Thr Asp Gly Met Ala Ser
 405 410 415

Val Ala Ala Tyr Thr Tyr Arg Gln His Ser Val Val Phe Ile Gly Thr
 420 425 430

Arg Ser Gly Ser Leu Lys Lys Val Arg Val Asp Gly Phe Gln Asp Ala
 435 440 445

His Leu Tyr Glu Thr Val Pro Val Val Asp Gly Ser Pro Ile Leu Arg
 450 455 460

Asp Leu Leu Phe Ser Pro Asp His Arg His Ile Tyr Leu Leu Ser Glu
 465 470 475 480

Lys Gln Val Ser Gln Leu Pro Val Glu Thr Cys Glu Gln Tyr Gln Ser
 485 490 495

Cys Ala Ala Cys Leu Gly Ser Gly Asp Pro His Cys Gly Trp Cys Val
 500 505 510

Leu Arg His Arg Cys Cys Arg Glu Gly Ala Cys Leu Gly Ala Ser Ala
 515 520 525

Pro His Gly Phe Ala Glu Glu Leu Ser Lys Cys Val Gln Val Arg Val
 530 535 540

Arg Pro Asn Asn Val Ser Val Thr Ser Pro Gly Val Gln Leu Thr Val
 545 550 555 560

Thr Leu His Asn Val Pro Asp Leu Ser Ala Gly Val Ser Cys Ala Phe
 565 570 575

Glu Ala Ala Ala Glu Asn Glu Ala Val Leu Leu Pro Ser Gly Glu Leu
 580 585 590

Leu Cys Pro Ser Pro Ser Leu Gln Glu Leu Arg Ala Leu Thr Arg Gly
 595 600 605

His Gly Ala Thr Arg Thr Val Arg Leu Gln Leu Leu Ser Lys Glu Thr
 610 615 620

Gly Val Arg Phe Ala Gly Ala Asp Phe Val Phe Tyr Asn Cys Ser Val
 625 630 635 640

ES 2 620 487 T3

Leu Gln Ser Cys Met Ser Cys Val Gly Ser Pro Tyr Pro Cys His Trp
 645 650 655
 Cys Lys Tyr Arg His Thr Cys Thr Ser Arg Pro His Glu Cys Ser Phe
 660 665 670
 Gln Glu Gly Arg Val His Ser Pro Glu Gly Cys Pro Glu Ile Leu Pro
 675 680 685
 Ser Gly Asp Leu Leu Ile Pro Val Gly Val Met Gln Pro Leu Thr Leu
 690 695 700
 Arg Ala Lys Asn Leu Pro Gln Pro Gln Ser Gly Gln Lys Asn Tyr Glu
 705 710 715 720
 Cys Val Val Arg Val Gln Gly Arg Gln Gln Arg Val Pro Ala Val Arg
 725 730 735
 Phe Asn Ser Ser Ser Val Gln Cys Gln Asn Ala Ser Tyr Ser Tyr Glu
 740 745 750
 Gly Asp Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Asp Phe Ser Val Val Trp Asp
 755 760 765
 Gly Asp Phe Pro Ile Asp Lys Pro Pro Ser Phe Arg Ala Leu Leu Tyr
 770 775 780
 Lys Cys Trp Ala Gln Arg Pro Ser Cys Gly Leu Cys Leu Lys Ala Asp
 785 790 795 800
 Pro Arg Phe Asn Cys Gly Trp Cys Ile Ser Glu His Arg Cys Gln Leu
 805 810 815
 Arg Thr His Cys Pro Ala Pro Lys Thr Asn Trp Met His Leu Ser Gln
 820 825 830
 Lys Gly Thr Arg Cys Ser His Pro Arg Ile Thr Gln Ile His Pro Leu
 835 840 845
 Val Gly Pro Lys Glu Gly Gly Thr Arg Val Thr Ile Val Gly Asp Asn
 850 855 860
 Leu Gly Leu Leu Ser Arg Glu Val Gly Leu Arg Val Ala Gly Val Arg
 865 870 875 880
 Cys Asn Ser Ile Pro Ala Glu Tyr Ile Ser Ala Glu Arg Ile Val Cys
 885 890 895
 Glu Met Glu Glu Ser Leu Val Pro Ser Pro Pro Pro Gly Pro Val Glu
 900 905 910
 Leu Cys Val Gly Asp Cys Ser Ala Asp Phe Arg Thr Gln Ser Glu Gln
 915 920 925

ES 2 620 487 T3

Val Tyr Ser Phe Val Thr Pro Thr Phe Asp Gln Val Ser Pro Ser Arg
 930 935 940

Gly Pro Ala Ser Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ser Gly Ser Ser Leu
 945 950 955 960

Asp Ala Gly Ser Arg Val Thr Val Thr Val Arg Asp Ser Glu Cys Gln
 965 970 975

Phe Val Arg Arg Asp Ala Lys Ala Ile Val Cys Ile Ser Pro Leu Ser
 980 985 990

Thr Leu Gly Pro Ser Gln Ala Pro Ile Thr Leu Ala Ile Asp Arg Ala
 995 1000 1005

Asn Ile Ser Ser Pro Gly Leu Ile Tyr Thr Tyr Thr Gln Asp Pro
 1010 1015 1020

Thr Val Thr Arg Leu Glu Pro Thr Trp Ser Ile Ile Asn Gly Ser
 1025 1030 1035

Thr Ala Ile Thr Val Ser Gly Thr His Leu Leu Thr Val Gln Glu
 1040 1045 1050

Pro Arg Val Arg Ala Lys Tyr Arg Gly Ile Glu Thr Thr Asn Thr
 1055 1060 1065

Cys Gln Val Ile Asn Asp Thr Ala Met Leu Cys Lys Ala Pro Gly
 1070 1075 1080

Ile Phe Leu Gly Arg Pro Gln Pro Arg Ala Gln Gly Glu His Pro
 1085 1090 1095

Asp Glu Phe Gly Phe Leu Leu Asp His Val Gln Thr Ala Arg Ser
 1100 1105 1110

Leu Asn Arg Ser Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Pro Ser Phe Glu
 1115 1120 1125

Pro Leu Gly Pro Ser Gly Val Leu Asp Val Lys Pro Gly Ser His
 1130 1135 1140

Val Val Leu Lys Gly Lys Asn Leu Ile Pro Ala Ala Ala Gly Ser
 1145 1150 1155

Ser Arg Leu Asn Tyr Thr Val Leu Ile Gly Gly Gln Pro Cys Ser
 1160 1165 1170

Leu Thr Val Ser Asp Thr Gln Leu Leu Cys Asp Ser Pro Ser Gln
 1175 1180 1185

Thr Gly Arg Gln Pro Val Met Val Leu Val Gly Gly Leu Glu Phe

ES 2 620 487 T3

1190		1195		1200
Trp Leu Gly Thr Leu His Ile Ser Ala Glu Arg Ala Leu Thr Leu 1205 1210 1215				
Pro Ala Met Met Gly Leu Ala Ala Gly Gly Gly Leu Leu Leu Leu 1220 1225 1230				
Ala Ile Thr Ala Val Leu Val Ala Tyr Lys Arg Lys Thr Gln Asp 1235 1240 1245				
Ala Asp Arg Thr Leu Lys Arg Leu Gln Leu Gln Met Asp Asn Leu 1250 1255 1260				
Glu Ser Arg Val Ala Leu Glu Cys Lys Glu Ala Phe Ala Glu Leu 1265 1270 1275				
Gln Thr Asp Ile Asn Glu Leu Thr Asn His Met Asp Glu Val Gln 1280 1285 1290				
Ile Pro Phe Leu Asp Tyr Arg Thr Tyr Ala Val Arg Val Leu Phe 1295 1300 1305				
Pro Gly Ile Glu Ala His Pro Val Leu Lys Glu Leu Asp Thr Pro 1310 1315 1320				
Pro Asn Val Glu Lys Ala Leu Arg Leu Phe Gly Gln Leu Leu His 1325 1330 1335				
Ser Arg Ala Phe Val Leu Thr Phe Ile His Thr Leu Glu Ala Gln 1340 1345 1350				
Ser Ser Phe Ser Met Arg Asp Arg Gly Thr Val Ala Ser Leu Thr 1355 1360 1365				
Met Val Ala Leu Gln Ser Arg Leu Asp Tyr Ala Thr Gly Leu Leu 1370 1375 1380				
Lys Gln Leu Leu Ala Asp Leu Ile Glu Lys Asn Leu Glu Ser Lys 1385 1390 1395				
Asn His Pro Lys Leu Leu Leu Arg Arg Thr Glu Ser Val Ala Glu 1400 1405 1410				
Lys Met Leu Thr Asn Trp Phe Thr Phe Leu Leu His Lys Phe Leu 1415 1420 1425				
Lys Glu Cys Ala Gly Glu Pro Leu Phe Leu Leu Tyr Cys Ala Ile 1430 1435 1440				
Lys Gln Gln Met Glu Lys Gly Pro Ile Asp Ala Ile Thr Gly Glu 1445 1450 1455				

ES 2 620 487 T3

Ala Arg Tyr Ser Leu Ser Glu Asp Lys Leu Ile Arg Gln Gln Ile
1460 1465 1470

Asp Tyr Lys Thr Leu Thr Leu His Cys Val Cys Pro Glu Asn Glu
1475 1480 1485

Gly Ser Ala Gln Val Pro Val Lys Val Leu Asn Cys Asp Ser Ile
1490 1495 1500

Thr Gln Ala Lys Asp Lys Leu Leu Asp Thr Val Tyr Lys Gly Ile
1505 1510 1515

Pro Tyr Ser Gln Arg Pro Lys Ala Glu Asp Met Asp Leu Glu Trp
1520 1525 1530

Arg Gln Gly Arg Met Thr Arg Ile Ile Leu Gln Asp Glu Asp Val
1535 1540 1545

Thr Thr Lys Ile Glu Cys Asp Trp Lys Arg Leu Asn Ser Leu Ala
1550 1555 1560

His Tyr Gln Val Thr Asp Gly Ser Leu Val Ala Leu Val Pro Lys
1565 1570 1575

Gln Val Ser Ala Tyr Asn Met Ala Asn Ser Phe Thr Phe Thr Arg
1580 1585 1590

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

Asp Ser Leu Arg Ser Arg Ala Pro Met Ile Thr Pro Asp Gln Glu
1610 1615 1620

Thr Gly Thr Lys Leu Trp His Leu Val Lys Asn His Asp His Ala
1625 1630 1635

Asp His Arg Glu Gly Asp Arg Gly Ser Lys Met Val Ser Glu Ile
1640 1645 1650

Tyr Leu Thr Arg Leu Leu Ala Thr Lys Gly Thr Leu Gln Lys Phe
1655 1660 1665

Val Asp Asp Leu Phe Glu Thr Val Phe Ser Thr Ala His Arg Gly
1670 1675 1680

Ser Ala Leu Pro Leu Ala Ile Lys Tyr Met Phe Asp Phe Leu Asp
1685 1690 1695

Glu Gln Ala Asp Gln Arg Gln Ile Ser Asp Pro Asp Val Arg His
1700 1705 1710

Thr Trp Lys Ser Asn Cys Leu Pro Leu Arg Phe Trp Val Asn Val
1715 1720 1725

Ile Lys Asn Pro Gln Phe Val Phe Asp Ile His Lys Asn Ser Ile
 1730 1735 1740

Thr Asp Ala Cys Leu Ser Val Val Ala Gln Thr Phe Met Asp Ser
 1745 1750 1755

Cys Ser Thr Ser Glu His Arg Leu Gly Lys Asp Ser Pro Ser Asn
 1760 1765 1770

Lys Leu Leu Tyr Ala Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Lys Ser Trp Val
 1775 1780 1785

Glu Arg Tyr Tyr Arg Asp Ile Ala Lys Met Ala Ser Ile Ser Asp
 1790 1795 1800

Gln Asp Met Asp Ala Tyr Leu Val Glu Gln Ser Arg Leu His Ala
 1805 1810 1815

Ser Asp Phe Ser Val Leu Ser Ala Leu Asn Glu Leu Tyr Phe Tyr
 1820 1825 1830

Val Thr Lys Tyr Arg Gln Glu Ile Leu Thr Ala Leu Asp Arg Asp
 1835 1840 1845

Ala Ser Cys Arg Lys His Lys Leu Arg Gln Lys Leu Glu Gln Ile
 1850 1855 1860

Ile Ser Leu Val Ser Ser Asp Ser
 1865 1870

<210> 22
 <211> 1894
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 22
 Met Lys Ala Met Pro Trp Asn Trp Thr Cys Leu Leu Ser His Leu Leu
 1 5 10 15
 Met Val Gly Met Gly Ser Ser Thr Leu Leu Thr Arg Gln Pro Ala Pro
 20 25 30
 Leu Ser Gln Lys Gln Arg Ser Phe Val Thr Phe Arg Gly Glu Pro Ala
 35 40 45
 Glu Gly Phe Asn His Leu Val Val Asp Glu Arg Thr Gly His Ile Tyr
 50 55 60
 Leu Gly Ala Val Asn Arg Ile Tyr Lys Leu Ser Ser Asp Leu Lys Val
 65 70 75 80
 Leu Val Thr His Glu Thr Gly Pro Asp Glu Asp Asn Pro Lys Cys Tyr
 85 90 95

10

ES 2 620 487 T3

Pro Pro Arg Ile Val Gln Thr Cys Asn Glu Pro Leu Thr Thr Thr Asn
 100 105 110

Asn Val Asn Lys Met Leu Leu Ile Asp Tyr Lys Glu Asn Arg Leu Ile
 115 120 125

Ala Cys Gly Ser Leu Tyr Gln Gly Ile Cys Lys Leu Leu Arg Leu Glu
 130 135 140

Asp Leu Phe Lys Leu Gly Glu Pro Tyr His Lys Lys Glu His Tyr Leu
 145 150 155 160

Ser Gly Val Asn Glu Ser Gly Ser Val Phe Gly Val Ile Val Ser Tyr
 165 170 175

Ser Asn Leu Asp Asp Lys Leu Phe Ile Ala Thr Ala Val Asp Gly Lys
 180 185 190

Pro Glu Tyr Phe Pro Thr Ile Ser Ser Arg Lys Leu Thr Lys Asn Ser
 195 200 205

Glu Ala Asp Gly Met Phe Ala Tyr Val Phe His Asp Glu Phe Val Ala
 210 215 220

Ser Met Ile Lys Ile Pro Ser Asp Thr Phe Thr Ile Ile Pro Asp Phe
 225 230 235 240

Asp Ile Tyr Tyr Val Tyr Gly Phe Ser Ser Gly Asn Phe Val Tyr Phe
 245 250 255

Leu Thr Leu Gln Pro Glu Met Val Ser Pro Pro Gly Ser Thr Thr Lys
 260 265 270

Glu Gln Val Tyr Thr Ser Lys Leu Val Arg Leu Cys Lys Glu Asp Thr
 275 280 285

Ala Phe Asn Ser Tyr Val Glu Val Pro Ile Gly Cys Glu Arg Ser Gly
 290 295 300

Val Glu Tyr Arg Leu Leu Gln Ala Ala Tyr Leu Ser Lys Ala Gly Ala
 305 310 315 320

Val Leu Gly Arg Thr Leu Gly Val His Pro Asp Asp Asp Leu Leu Phe
 325 330 335

Thr Val Phe Ser Lys Gly Gln Lys Arg Lys Met Lys Ser Leu Asp Glu
 340 345 350

Ser Ala Leu Cys Ile Phe Ile Leu Lys Gln Ile Asn Asp Arg Ile Lys
 355 360 365

Glu Arg Leu Gln Ser Cys Tyr Arg Gly Glu Gly Thr Leu Asp Leu Ala
 370 375 380

ES 2 620 487 T3

Trp Leu Lys Val Lys Asp Ile Pro Cys Ser Ser Ala Leu Leu Thr Ile
 385 390 395 400

Asp Asp Asn Phe Cys Gly Leu Asp Met Asn Ala Pro Leu Gly Val Ser
 405 410 415

Asp Met Val Arg Gly Ile Pro Val Phe Thr Glu Asp Arg Asp Arg Met
 420 425 430

Thr Ser Val Ile Ala Tyr Val Tyr Lys Asn His Ser Leu Ala Phe Val
 435 440 445

Gly Thr Lys Ser Gly Lys Leu Lys Lys Ile Arg Val Asp Gly Pro Arg
 450 455 460

Gly Asn Ala Leu Gln Tyr Glu Thr Val Gln Val Val Asp Pro Gly Pro
 465 470 475 480

Val Leu Arg Asp Met Ala Phe Ser Lys Asp His Glu Gln Leu Tyr Ile
 485 490 495

Met Ser Glu Arg Gln Leu Thr Arg Val Pro Val Glu Ser Cys Gly Gln
 500 505 510

Tyr Gln Ser Cys Gly Glu Cys Leu Gly Ser Gly Asp Pro His Cys Gly
 515 520 525

Trp Cys Val Leu His Asn Thr Cys Thr Arg Lys Glu Arg Cys Glu Arg
 530 535 540

Ser Lys Glu Pro Arg Arg Phe Ala Ser Glu Met Lys Gln Cys Val Arg
 545 550 555 560

Leu Thr Val His Pro Asn Asn Ile Ser Val Ser Gln Tyr Asn Val Leu
 565 570 575

Leu Val Leu Glu Thr Tyr Asn Val Pro Glu Leu Ser Ala Gly Val Asn
 580 585 590

Cys Thr Phe Glu Asp Leu Ser Glu Met Asp Gly Leu Val Val Gly Asn
 595 600 605

Gln Ile Gln Cys Tyr Ser Pro Ala Ala Lys Glu Val Pro Arg Ile Ile
 610 615 620

Thr Glu Asn Gly Asp His His Val Val Gln Leu Gln Leu Lys Ser Lys
 625 630 635 640

Glu Thr Gly Met Thr Phe Ala Ser Thr Ser Phe Val Phe Tyr Asn Cys
 645 650 655

Ser Val His Asn Ser Cys Leu Ser Cys Val Glu Ser Pro Tyr Arg Cys

ES 2 620 487 T3

Ser Ser Gln Leu Tyr Tyr Phe Met Thr Leu Thr Leu Ser Asp Leu Lys
 945 950 955 960

Pro Ser Arg Gly Pro Met Ser Gly Gly Thr Gln Val Thr Ile Thr Gly
 965 970 975

Thr Asn Leu Asn Ala Gly Ser Asn Val Val Val Met Phe Gly Lys Gln
 980 985 990

Pro Cys Leu Phe His Arg Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Val Cys Asn Thr
 995 1000 1005

Thr Ser Ser Asp Glu Val Leu Glu Met Lys Val Ser Val Gln Val
 1010 1015 1020

Asp Arg Ala Lys Ile His Gln Asp Leu Val Phe Gln Tyr Val Glu
 1025 1030 1035

Asp Pro Thr Ile Val Arg Ile Glu Pro Glu Trp Ser Ile Val Ser
 1040 1045 1050

Gly Asn Thr Pro Ile Ala Val Trp Gly Thr His Leu Asp Leu Ile
 1055 1060 1065

Gln Asn Pro Gln Ile Arg Ala Lys His Gly Gly Lys Glu His Ile
 1070 1075 1080

Asn Ile Cys Glu Val Leu Asn Ala Thr Glu Met Thr Cys Gln Ala
 1085 1090 1095

Pro Ala Leu Ala Leu Gly Pro Asp His Gln Ser Asp Leu Thr Glu
 1100 1105 1110

Arg Pro Glu Glu Phe Gly Phe Ile Leu Asp Asn Val Gln Ser Leu
 1115 1120 1125

Leu Ile Leu Asn Lys Thr Asn Phe Thr Tyr Tyr Pro Asn Pro Val
 1130 1135 1140

Phe Glu Ala Phe Gly Pro Ser Gly Ile Leu Glu Leu Lys Pro Gly
 1145 1150 1155

Thr Pro Ile Ile Leu Lys Gly Lys Asn Leu Ile Pro Pro Val Ala
 1160 1165 1170

Gly Gly Asn Val Lys Leu Asn Tyr Thr Val Leu Val Gly Glu Lys
 1175 1180 1185

Pro Cys Thr Val Thr Val Ser Asp Val Gln Leu Leu Cys Glu Ser
 1190 1195 1200

Pro Asn Leu Ile Gly Arg His Lys Val Met Ala Arg Val Gly Gly
 1205 1210 1215

Met Glu Tyr Ser Pro Gly Met Val Tyr Ile Ala Pro Asp Ser Pro
 1220 1225 1230

Leu Ser Leu Pro Ala Ile Val Ser Ile Ala Val Ala Gly Gly Leu
 1235 1240 1245

Leu Ile Ile Phe Ile Val Ala Val Leu Ile Ala Tyr Lys Arg Lys
 1250 1255 1260

Ser Arg Glu Ser Asp Leu Thr Leu Lys Arg Leu Gln Met Gln Met
 1265 1270 1275

Asp Asn Leu Glu Ser Arg Val Ala Leu Glu Cys Lys Glu Ala Phe
 1280 1285 1290

Ala Glu Leu Gln Thr Asp Ile His Glu Leu Thr Ser Asp Leu Asp
 1295 1300 1305

Gly Ala Gly Ile Pro Phe Leu Asp Tyr Arg Thr Tyr Thr Met Arg
 1310 1315 1320

Val Leu Phe Pro Gly Ile Glu Asp His Pro Val Leu Arg Asp Leu
 1325 1330 1335

Glu Val Pro Gly Tyr Arg Gln Glu Arg Val Glu Lys Gly Leu Lys
 1340 1345 1350

Leu Phe Ala Gln Leu Ile Asn Asn Lys Val Phe Leu Leu Ser Phe
 1355 1360 1365

Ile Arg Thr Leu Glu Ser Gln Arg Ser Phe Ser Met Arg Asp Arg
 1370 1375 1380

Gly Asn Val Ala Ser Leu Ile Met Thr Val Leu Gln Ser Lys Leu
 1385 1390 1395

Glu Tyr Ala Thr Asp Val Leu Lys Gln Leu Leu Ala Asp Leu Ile
 1400 1405 1410

Asp Lys Asn Leu Glu Ser Lys Asn His Pro Lys Leu Leu Leu Arg
 1415 1420 1425

Arg Thr Glu Ser Val Ala Glu Lys Met Leu Thr Asn Trp Phe Thr
 1430 1435 1440

Phe Leu Leu Tyr Lys Phe Leu Lys Glu Cys Ala Gly Glu Pro Leu
 1445 1450 1455

Phe Ser Leu Phe Cys Ala Ile Lys Gln Gln Met Glu Lys Gly Pro
 1460 1465 1470

Ile Asp Ala Ile Thr Gly Glu Ala Arg Tyr Ser Leu Ser Glu Asp
 1475 1480 1485

ES 2 620 487 T3

Lys Leu Ile Arg Gln Gln Ile Asp Tyr Lys Thr Leu Val Leu Ser
 1490 1495 1500

Cys Val Ser Pro Asp Asn Ala Asn Ser Pro Glu Val Pro Val Lys
 1505 1510 1515

Ile Leu Asn Cys Asp Thr Ile Thr Gln Val Lys Glu Lys Ile Leu
 1520 1525 1530

Asp Ala Ile Phe Lys Asn Val Pro Cys Ser His Arg Pro Lys Ala
 1535 1540 1545

Ala Asp Met Asp Leu Glu Trp Arg Gln Gly Ser Gly Ala Arg Met
 1550 1555 1560

Ile Leu Gln Asp Glu Asp Ile Thr Thr Lys Ile Glu Asn Asp Trp
 1565 1570 1575

Lys Arg Leu Asn Thr Leu Ala His Tyr Gln Val Pro Asp Gly Ser
 1580 1585 1590

Val Val Ala Leu Val Ser Lys Gln Val Thr Ala Tyr Asn Ala Val
 1595 1600 1605

Asn Asn Ser Thr Val Ser Arg Thr Ser Ala Ser Lys Tyr Glu Asn
 1610 1615 1620

Met Ile Arg Tyr Thr Gly Ser Pro Asp Ser Leu Arg Ser Arg Thr
 1625 1630 1635

Pro Met Ile Thr Pro Asp Leu Glu Ser Gly Val Lys Met Trp His
 1640 1645 1650

Leu Val Lys Asn His Glu His Gly Asp Gln Lys Glu Gly Asp Arg
 1655 1660 1665

Gly Ser Lys Met Val Ser Glu Ile Tyr Leu Thr Arg Leu Leu Ala
 1670 1675 1680

Thr Lys Gly Thr Leu Gln Lys Phe Val Asp Asp Leu Phe Glu Thr
 1685 1690 1695

Ile Phe Ser Thr Ala His Arg Gly Ser Ala Leu Pro Leu Ala Ile
 1700 1705 1710

Lys Tyr Met Phe Asp Phe Leu Asp Glu Gln Ala Asp Lys His Gly
 1715 1720 1725

Ile His Asp Pro His Val Arg His Thr Trp Lys Ser Asn Cys Leu
 1730 1735 1740

Pro Leu Arg Phe Trp Val Asn Met Ile Lys Asn Pro Gln Phe Val

ES 2 620 487 T3

				85						90					95
Pro	Pro	Arg	Ile	Val	Gln	Thr	Cys	Asn	Glu	Pro	Leu	Thr	Thr	Thr	Asn
			100					105						110	
Asn	Val	Asn	Lys	Met	Leu	Leu	Ile	Asp	Tyr	Lys	Glu	Asn	Arg	Leu	Ile
		115					120					125			
Ala	Cys	Gly	Ser	Leu	Tyr	Gln	Gly	Ile	Cys	Lys	Leu	Leu	Arg	Leu	Glu
	130					135					140				
Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Gly	Glu	Pro	Tyr	His	Lys	Lys	Glu	His	Tyr	Leu
145				150						155					160
Ser	Gly	Val	Asn	Glu	Ser	Gly	Ser	Val	Phe	Gly	Val	Ile	Val	Ser	Tyr
			165						170					175	
Ser	Asn	Leu	Asp	Asp	Lys	Leu	Phe	Ile	Ala	Thr	Ala	Val	Asp	Gly	Lys
			180				185						190		
Pro	Glu	Tyr	Phe	Pro	Thr	Ile	Ser	Ser	Arg	Lys	Leu	Thr	Lys	Asn	Ser
		195					200					205			
Glu	Ala	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Tyr	Val	Phe	His	Asp	Glu	Phe	Val	Ala
	210					215					220				
Ser	Met	Ile	Lys	Ile	Pro	Ser	Asp	Thr	Phe	Thr	Ile	Ile	Pro	Asp	Phe
225				230						235					240
Asp	Ile	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Gly	Phe	Ser	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	Tyr	Phe
				245					250					255	
Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Glu	Met	Val	Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Thr	Thr	Lys
			260					265					270		
Glu	Gln	Val	Tyr	Thr	Ser	Lys	Leu	Val	Arg	Leu	Cys	Lys	Glu	Asp	Thr
		275					280					285			
Ala	Phe	Asn	Ser	Tyr	Val	Glu	Val	Pro	Ile	Gly	Cys	Glu	Arg	Ser	Gly
	290					295					300				
Val	Glu	Tyr	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Ala	Tyr	Leu	Ser	Lys	Ala	Gly	Ala
305					310					315					320
Val	Leu	Gly	Arg	Thr	Leu	Gly	Val	His	Pro	Asp	Asp	Asp	Leu	Leu	Phe
				325					330					335	
Thr	Val	Phe	Ser	Lys	Gly	Gln	Lys	Arg	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu
			340					345					350		
Ser	Ala	Leu	Cys	Ile	Phe	Ile	Leu	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Arg	Ile	Lys
		355					360					365			

ES 2 620 487 T3

Glu Arg Leu Gln Ser Cys Tyr Arg Gly Glu Gly Thr Leu Asp Leu Ala
 370 375 380

Trp Leu Lys Val Lys Asp Ile Pro Cys Ser Ser Ala Leu Leu Thr Ile
 385 390 395 400

Asp Asp Asn Phe Cys Gly Leu Asp Met Asn Ala Pro Leu Gly Val Ser
 405 410 415

Asp Met Val Arg Gly Ile Pro Val Phe Thr Glu Asp Arg Asp Arg Met
 420 425 430

Thr Ser Val Ile Ala Tyr Val Tyr Lys Asn His Ser Leu Ala Phe Val
 435 440 445

Gly Thr Lys Ser Gly Lys Leu Lys Lys Met Pro Gly Thr Ser Leu Cys
 450 455 460

Pro Thr Leu Glu Leu Gln Thr Gly Pro Arg Ser His Arg Ala Thr Val
 465 470 475 480

Thr Leu Glu Leu Leu Phe Ser Ser Cys Ser Ser Asn
 485 490

<210> 24
 <211> 522
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 24
 Met Lys Ala Met Pro Trp Asn Trp Thr Cys Leu Leu Ser His Leu Leu
 1 5 10 15

Met Val Gly Met Gly Ser Ser Thr Leu Leu Thr Arg Gln Pro Ala Pro
 20 25 30

Leu Ser Gln Lys Gln Arg Ser Phe Val Thr Phe Arg Gly Glu Pro Ala
 35 40 45

Glu Gly Phe Asn His Leu Val Val Asp Glu Arg Thr Gly His Ile Tyr
 50 55 60

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

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

Pro Pro Arg Ile Val Gln Thr Cys Asn Glu Pro Leu Thr Thr Thr Asn
 100 105 110

Asn Val Asn Lys Met Leu Leu Ile Asp Tyr Lys Glu Asn Arg Leu Ile
 115 120 125

10

ES 2 620 487 T3

Ala Cys Gly Ser Leu Tyr Gln Gly Ile Cys Lys Leu Leu Arg Leu Glu
 130 135 140

Asp Leu Phe Lys Leu Gly Glu Pro Tyr His Lys Lys Glu His Tyr Leu
 145 150 155 160

Ser Gly Val Asn Glu Ser Gly Ser Val Phe Gly Val Ile Val Ser Tyr
 165 170 175

Ser Asn Leu Asp Asp Lys Leu Phe Ile Ala Thr Ala Val Asp Gly Lys
 180 185 190

Pro Glu Tyr Phe Pro Thr Ile Ser Ser Arg Lys Leu Thr Lys Asn Ser
 195 200 205

Glu Ala Asp Gly Met Phe Ala Tyr Val Phe His Asp Glu Phe Val Ala
 210 215 220

Ser Met Ile Lys Ile Pro Ser Asp Thr Phe Thr Ile Ile Pro Asp Phe
 225 230 235 240

Asp Ile Tyr Tyr Val Tyr Gly Phe Ser Ser Gly Asn Phe Val Tyr Phe
 245 250 255

Leu Thr Leu Gln Pro Glu Met Val Ser Pro Pro Gly Ser Thr Thr Lys
 260 265 270

Glu Gln Val Tyr Thr Ser Lys Leu Val Arg Leu Cys Lys Glu Asp Thr
 275 280 285

Ala Phe Asn Ser Tyr Val Glu Val Pro Ile Gly Cys Glu Arg Ser Gly
 290 295 300

Val Glu Tyr Arg Leu Leu Gln Ala Ala Tyr Leu Ser Lys Ala Gly Ala
 305 310 315 320

Val Leu Gly Arg Thr Leu Gly Val His Pro Asp Asp Asp Leu Leu Phe
 325 330 335

Thr Val Phe Ser Lys Gly Gln Lys Arg Lys Met Lys Ser Leu Asp Glu
 340 345 350

Ser Ala Leu Cys Ile Phe Ile Leu Lys Gln Ile Asn Asp Arg Ile Lys
 355 360 365

Glu Arg Leu Gln Ser Cys Tyr Arg Gly Glu Gly Thr Leu Asp Leu Ala
 370 375 380

Trp Leu Lys Val Lys Asp Ile Pro Cys Ser Ser Ala Leu Leu Thr Ile
 385 390 395 400

Asp Asp Asn Phe Cys Gly Leu Asp Met Asn Ala Pro Leu Gly Val Ser
 405 410 415

ES 2 620 487 T3

Asp Met Val Arg Gly Ile Pro Val Phe Thr Glu Asp Arg Asp Arg Met
420 425 430

Thr Ser Val Ile Ala Tyr Val Tyr Lys Asn His Ser Leu Ala Phe Val
435 440 445

Gly Thr Lys Ser Gly Lys Leu Lys Lys Ser Phe Gly Thr Gly Pro Gln
450 455 460

Gly Gly Ile Thr Gln Glu Trp Ile Gly Val Glu Gly Asp Pro Pro Gly
465 470 475 480

Ala Asn Ile Ala Ser Gln Glu Gln Met Leu Cys Val Tyr Leu Gln Cys
485 490 495

Ser Ser His Lys Ala Ile Ser Asp Gln Arg Val Gln Pro Leu Leu Cys
500 505 510

Cys Phe Leu Asn Val Pro Gly Asn Ser Ser
515 520

<210> 25

<211> 1925

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

Ala Ala Ser Pro Pro Pro Phe Gln Thr Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
20 25 30

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Ala Arg Ala Gly Ala Leu Glu
35 40 45

Ile Gln Arg Arg Phe Pro Ser Pro Thr Pro Thr Asn Asn Phe Ala Leu
50 55 60

Asp Gly Ala Ala Gly Thr Val Tyr Leu Ala Ala Val Asn Arg Leu Tyr
65 70 75 80

Gln Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ser Leu Glu Ala Glu Ala Ala Val Gly
85 90 95

Pro Val Pro Asp Ser Pro Leu Cys His Ala Pro Gln Leu Pro Gln Ala
100 105 110

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

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

10

ES 2 620 487 T3

Gln Gly Phe Cys Gln Leu Arg Arg Arg Gly Asn Ile Ser Ala Val Ala
 145 150 155 160

Val Arg Phe Pro Pro Ala Ala Pro Pro Ala Glu Pro Val Thr Val Phe
 165 170 175

Pro Ser Met Leu Asn Val Ala Ala Asn His Pro Asn Ala Ser Thr Val
 180 185 190

Gly Leu Val Leu Pro Pro Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu
 195 200 205

Val Gly Ala Thr Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Pro Arg Asn
 210 215 220

Arg Ser Leu Glu Asp His Arg Phe Glu Asn Thr Pro Glu Ile Ala Ile
 225 230 235 240

Arg Ser Leu Asp Thr Arg Gly Asp Leu Ala Lys Leu Phe Thr Phe Asp
 245 250 255

Leu Asn Pro Ser Asp Asp Asn Ile Leu Lys Ile Lys Gln Gly Ala Lys
 260 265 270

Glu Gln His Lys Leu Gly Phe Val Ser Ala Phe Leu His Pro Ser Asp
 275 280 285

Pro Pro Pro Gly Ala Gln Ser Tyr Ala Tyr Leu Ala Leu Asn Ser Glu
 290 295 300

Ala Arg Ala Gly Asp Lys Glu Ser Gln Ala Arg Ser Leu Leu Ala Arg
 305 310 315 320

Ile Cys Leu Pro His Gly Ala Gly Gly Asp Ala Lys Lys Leu Thr Glu
 325 330 335

Ser Tyr Ile Gln Leu Gly Leu Gln Cys Ala Gly Gly Ala Gly Arg Gly
 340 345 350

Asp Leu Tyr Ser Arg Leu Val Ser Val Phe Pro Ala Arg Glu Arg Leu
 355 360 365

Phe Ala Val Phe Glu Arg Pro Gln Gly Ser Pro Ala Ala Arg Ala Ala
 370 375 380

Pro Ala Ala Leu Cys Ala Phe Arg Phe Ala Asp Val Arg Ala Ala Ile
 385 390 395 400

Arg Ala Ala Arg Thr Ala Cys Phe Val Glu Pro Ala Pro Asp Val Val
 405 410 415

Ala Val Leu Asp Ser Val Val Gln Gly Thr Gly Pro Ala Cys Glu Arg
 420 425 430

ES 2 620 487 T3

Lys Leu Asn Ile Gln Leu Gln Pro Glu Gln Leu Asp Cys Gly Ala Ala
 435 440 445

His Leu Gln His Pro Leu Ser Ile Leu Gln Pro Leu Lys Ala Thr Pro
 450 455 460

Val Phe Arg Ala Pro Gly Leu Thr Ser Val Ala Val Ala Ser Val Asn
 465 470 475 480

Asn Tyr Thr Ala Val Phe Leu Gly Thr Val Asn Gly Arg Leu Leu Lys
 485 490 495

Ile Asn Leu Asn Glu Ser Met Gln Val Val Ser Arg Arg Val Val Thr
 500 505 510

Val Ala Tyr Gly Glu Pro Val His His Val Met Gln Phe Asp Pro Ala
 515 520 525

Asp Ser Gly Tyr Leu Tyr Leu Met Thr Ser His Gln Met Ala Arg Val
 530 535 540

Lys Val Ala Ala Cys Asn Val His Ser Thr Cys Gly Asp Cys Val Gly
 545 550 555 560

Ala Ala Asp Ala Tyr Cys Gly Trp Cys Ala Leu Glu Thr Arg Cys Thr
 565 570 575

Leu Gln Gln Asp Cys Thr Asn Ser Ser Gln Gln His Phe Trp Thr Ser
 580 585 590

Ala Ser Glu Gly Pro Ser Arg Cys Pro Ala Met Thr Val Leu Pro Ser
 595 600 605

Glu Ile Asp Val Arg Gln Glu Tyr Pro Gly Met Ile Leu Gln Ile Ser
 610 615 620

Gly Ser Leu Pro Ser Leu Ser Gly Met Glu Met Ala Cys Asp Tyr Gly
 625 630 635 640

Asn Asn Ile Arg Thr Val Ala Arg Val Pro Gly Pro Ala Phe Gly His
 645 650 655

Gln Ile Ala Tyr Cys Asn Leu Leu Pro Arg Asp Gln Phe Pro Pro Phe
 660 665 670

Pro Pro Asn Gln Asp His Val Thr Val Glu Met Ser Val Arg Val Asn
 675 680 685

Gly Arg Asn Ile Val Lys Ala Asn Phe Thr Ile Tyr Asp Cys Ser Arg
 690 695 700

Thr Ala Gln Val Tyr Pro His Thr Ala Cys Thr Ser Cys Leu Ser Ala

ES 2 620 487 T3

Lys Ala Gly Gly Thr Arg Ile Thr Ile His Gly Asn Asp Leu His Val
 995 1000 1005

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

Glu Leu Met Arg Thr Asp Thr Ser Ile Ala Cys Thr Met Pro Glu
 1025 1030 1035

Gly Ala Leu Pro Ala Pro Val Pro Val Cys Val Arg Phe Glu Arg
 1040 1045 1050

Arg Gly Cys Val His Gly Asn Leu Thr Phe Trp Tyr Met Gln Asn
 1055 1060 1065

Pro Val Ile Thr Ala Ile Ser Pro Arg Arg Ser Pro Val Ser Gly
 1070 1075 1080

Gly Arg Thr Ile Thr Val Ala Gly Glu Arg Phe His Met Val Gln
 1085 1090 1095

Asn Val Ser Met Ala Val His His Ile Gly Arg Glu Pro Thr Leu
 1100 1105 1110

Cys Lys Val Leu Asn Ser Thr Leu Ile Thr Cys Pro Ser Pro Gly
 1115 1120 1125

Ala Leu Ser Asn Ala Ser Ala Pro Val Asp Phe Phe Ile Asn Gly
 1130 1135 1140

Arg Ala Tyr Ala Asp Glu Val Ala Val Ala Glu Glu Leu Leu Asp
 1145 1150 1155

Pro Glu Glu Ala Gln Arg Gly Ser Arg Phe Arg Leu Asp Tyr Leu
 1160 1165 1170

Pro Asn Pro Gln Phe Ser Thr Ala Lys Arg Glu Lys Trp Ile Lys
 1175 1180 1185

His His Pro Gly Glu Pro Leu Thr Leu Val Ile His Lys Glu Gln
 1190 1195 1200

Asp Ser Leu Gly Leu Gln Ser His Glu Tyr Arg Val Lys Ile Gly
 1205 1210 1215

Gln Val Ser Cys Asp Ile Gln Ile Val Ser Asp Arg Ile Ile His
 1220 1225 1230

Cys Ser Val Asn Glu Ser Leu Gly Ala Ala Val Gly Gln Leu Pro
 1235 1240 1245

Ile Thr Ile Gln Val Gly Asn Phe Asn Gln Thr Ile Ala Thr Leu
 1250 1255 1260

ES 2 620 487 T3

Gln Leu Gly Gly Ser Glu Thr Ala Ile Ile Val Ser Ile Val Ile
 1265 1270 1275

Cys Ser Val Leu Leu Leu Leu Ser Val Val Ala Leu Phe Val Phe
 1280 1285 1290

Cys Thr Lys Ser Arg Arg Ala Glu Arg Tyr Trp Gln Lys Thr Leu
 1295 1300 1305

Leu Gln Met Glu Glu Met Glu Ser Gln Ile Arg Glu Glu Ile Arg
 1310 1315 1320

Lys Gly Phe Ala Glu Leu Gln Thr Asp Met Thr Asp Leu Thr Lys
 1325 1330 1335

Glu Leu Asn Arg Ser Gln Gly Ile Pro Phe Leu Glu Tyr Lys His
 1340 1345 1350

Phe Val Thr Arg Thr Phe Phe Pro Lys Cys Ser Ser Leu Tyr Glu
 1355 1360 1365

Glu Arg Tyr Val Leu Pro Ser Gln Thr Leu Asn Ser Gln Gly Ser
 1370 1375 1380

Ser Gln Ala Gln Glu Thr His Pro Leu Leu Gly Glu Trp Lys Ile
 1385 1390 1395

Pro Glu Ser Cys Arg Pro Asn Met Glu Glu Gly Ile Ser Leu Phe
 1400 1405 1410

Ser Ser Leu Leu Asn Asn Lys His Phe Leu Ile Val Phe Val His
 1415 1420 1425

Ala Leu Glu Gln Gln Lys Asp Phe Ala Val Arg Asp Arg Cys Ser
 1430 1435 1440

Leu Ala Ser Leu Leu Thr Ile Ala Leu His Gly Lys Leu Glu Tyr
 1445 1450 1455

Tyr Thr Ser Ile Met Lys Glu Leu Leu Val Asp Leu Ile Asp Ala
 1460 1465 1470

Ser Ala Ala Lys Asn Pro Lys Leu Met Leu Arg Arg Thr Glu Ser
 1475 1480 1485

Val Val Glu Lys Met Leu Thr Asn Trp Met Ser Ile Cys Met Tyr
 1490 1495 1500

Ser Cys Leu Arg Glu Thr Val Gly Glu Pro Phe Phe Leu Leu Leu
 1505 1510 1515

Cys Ala Ile Lys Gln Gln Ile Asn Lys Gly Ser Ile Asp Ala Ile
 1520 1525 1530

ES 2 620 487 T3

Thr Gly Lys Ala Arg Tyr Thr Leu Asn Glu Glu Trp Leu Leu Arg
 1535 1540 1545

Glu Asn Ile Glu Ala Lys Pro Arg Asn Leu Asn Val Ser Phe Gln
 1550 1555 1560

Gly Cys Gly Met Asp Ser Leu Ser Val Arg Ala Met Asp Thr Asp
 1565 1570 1575

Thr Leu Thr Gln Val Lys Glu Lys Ile Leu Glu Ala Phe Cys Lys
 1580 1585 1590

Asn Val Pro Tyr Ser Gln Trp Pro Arg Ala Glu Asp Val Asp Leu
 1595 1600 1605

Glu Trp Phe Ala Ser Ser Thr Gln Ser Tyr Ile Leu Arg Asp Leu
 1610 1615 1620

Asp Asp Thr Ser Val Val Glu Asp Gly Arg Lys Lys Leu Asn Thr
 1625 1630 1635

Leu Ala His Tyr Lys Ile Pro Glu Gly Ala Ser Leu Ala Met Ser
 1640 1645 1650

Leu Ile Asp Lys Lys Asp Asn Thr Leu Gly Arg Val Lys Asp Leu
 1655 1660 1665

Asp Thr Glu Lys Tyr Phe His Leu Val Leu Pro Thr Asp Glu Leu
 1670 1675 1680

Ala Glu Pro Lys Lys Ser His Arg Gln Ser His Arg Lys Lys Val
 1685 1690 1695

Leu Pro Glu Ile Tyr Leu Thr Arg Leu Leu Ser Thr Lys Gly Thr
 1700 1705 1710

Leu Gln Lys Phe Leu Asp Asp Leu Phe Lys Ala Ile Leu Ser Ile
 1715 1720 1725

Arg Glu Asp Lys Pro Pro Leu Ala Val Lys Tyr Phe Phe Asp Phe
 1730 1735 1740

Leu Glu Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gly Ile Ser Asp Pro Asp Thr
 1745 1750 1755

Leu His Ile Trp Lys Thr Asn Ser Leu Pro Leu Arg Phe Trp Val
 1760 1765 1770

Asn Ile Leu Lys Asn Pro Gln Phe Val Phe Asp Ile Asp Lys Thr
 1775 1780 1785

Asp His Ile Asp Ala Cys Leu Ser Val Ile Ala Gln Ala Phe Ile

ES 2 620 487 T3

Thr Phe Gly Gly Phe Asp Ser Thr Lys Asp Leu Pro Asp Asp Val Ile
 385 390 395 400

Thr Phe Ala Arg Ser His Pro Ala Met Tyr Asn Pro Val Phe Pro Met
 405 410 415

Asn Asn Arg Pro Ile Val Ile Lys Thr Asp Val Asn Tyr Gln Phe Thr
 420 425 430

Gln Ile Val Val Asp Arg Val Asp Ala Glu Asp Gly Gln Tyr Asp Val
 435 440 445

Met Phe Ile Gly Thr Asp Val Gly Thr Val Leu Lys Val Val Ser Ile
 450 455 460

Pro Lys Glu Thr Trp Tyr Asp Leu Glu Glu Val Leu Leu Glu Glu Met
 465 470 475 480

Thr Val Phe Arg Glu Pro Thr Ala Ile Ser Ala Met Glu Leu Ser Thr
 485 490 495

Lys Gln Gln Gln Leu Tyr Ile Gly Ser Thr Ala Gly Val Ala Gln Leu
 500 505 510

Pro Leu His Arg Cys Asp Ile Tyr Gly Lys Ala Cys Ala Glu Cys Cys
 515 520 525

Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly Ser Ala Cys Ser Arg
 530 535 540

Tyr Phe Pro Thr Ala Lys Arg Arg Thr Arg Arg Gln Asp Ile Arg Asn
 545 550 555 560

Gly Asp Pro Leu Thr His Cys Ser Asp Leu His His Asp Asn His His
 565 570 575

Gly His Ser Pro Glu Glu Arg Ile Ile Tyr Gly Val Glu Asn Ser Ser
 580 585 590

Thr Phe Leu Glu Cys Ser Pro Lys Ser Gln Arg Ala Leu Val Tyr Trp
 595 600 605

Gln Phe Gln Arg Arg Asn Glu Glu Arg Lys Glu Glu Ile Arg Val Asp
 610 615 620

Asp His Ile Ile Arg Thr Asp Gln Gly Leu Leu Leu Arg Ser Leu Gln
 625 630 635 640

Gln Lys Asp Ser Gly Asn Tyr Leu Cys His Ala Val Glu His Gly Phe
 645 650 655

Ile Gln Thr Leu Leu Lys Val Thr Leu Glu Val Ile Asp Thr Glu His
 660 665 670

ES 2 620 487 T3

Leu Glu Glu Leu Leu His Lys Asp Asp Asp Gly Asp Gly Ser Lys Thr
675 680 685

Lys Glu Met Ser Asn Ser Met Thr Pro Ser Gln Lys Val Trp Tyr Arg
690 695 700

Asp Phe Met Gln Leu Ile Asn His Pro Asn Leu Asn Thr Met Asp Glu
705 710 715 720

Phe Cys Glu Gln Val Trp Lys Arg Asp Arg Lys Gln Arg Arg Gln Arg
725 730 735

Pro Gly His Thr Pro Gly Asn Ser Asn Lys Trp Lys His Leu Gln Glu
740 745 750

Asn Lys Lys Gly Arg Asn Arg Arg Thr His Glu Phe Glu Arg Ala Pro
755 760 765

Arg Ser Val
770

<210> 27

<211> 748

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Gly Arg Ala Gly Ala Ala Ala Val Ile Pro Gly Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

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

Leu Ser Phe Gln Glu Leu Gln Ala Trp His Gly Leu Gln Thr Phe Ser
35 40 45

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

Gly Arg Leu Phe Val Gly Ala Glu Asn His Val Ala Ser Leu Asn Leu
65 70 75 80

Asp Asn Ile Ser Lys Arg Ala Lys Lys Leu Ala Trp Pro Ala Pro Val
85 90 95

Glu Trp Arg Glu Glu Cys Asn Trp Ala Gly Lys Asp Ile Gly Thr Glu
100 105 110

Cys Met Asn Phe Val Lys Leu Leu His Ala Tyr Asn Arg Thr His Leu
115 120 125

Leu Ala Cys Gly Thr Gly Ala Phe His Pro Thr Cys Ala Phe Val Glu
130 135 140

10

ES 2 620 487 T3

Val Gly His Arg Ala Glu Glu Pro Val Leu Arg Leu Asp Pro Gly Arg
 145 150 155 160

Ile Glu Asp Gly Lys Gly Lys Ser Pro Tyr Asp Pro Arg His Arg Ala
 165 170 175

Ala Ser Val Leu Val Gly Glu Glu Leu Tyr Ser Gly Val Ala Ala Asp
 180 185 190

Leu Met Gly Arg Asp Phe Thr Ile Phe Arg Ser Leu Gly Gln Arg Pro
 195 200 205

Ser Leu Arg Thr Glu Pro His Asp Ser Arg Trp Leu Asn Glu Pro Lys
 210 215 220

Phe Val Lys Val Phe Trp Ile Pro Glu Ser Glu Asn Pro Asp Asp Asp
 225 230 235 240

Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Arg Glu Thr Ala Val Glu Ala Ala Pro Ala
 245 250 255

Leu Gly Arg Leu Ser Val Ser Arg Val Gly Gln Ile Cys Arg Asn Asp
 260 265 270

Val Gly Gly Gln Arg Ser Leu Val Asn Lys Trp Thr Thr Phe Leu Lys
 275 280 285

Ala Arg Leu Val Cys Ser Val Pro Gly Val Glu Gly Asp Thr His Phe
 290 295 300

Asp Gln Leu Gln Asp Val Phe Leu Leu Ser Ser Arg Asp His Arg Thr
 305 310 315 320

Pro Leu Leu Tyr Ala Val Phe Ser Thr Ser Ser Ile Phe Gln Gly Ser
 325 330 335

Ala Val Cys Val Tyr Ser Met Asn Asp Val Arg Arg Ala Phe Leu Gly
 340 345 350

Pro Phe Ala His Lys Glu Gly Pro Met His Gln Trp Val Ser Tyr Gln
 355 360 365

Gly Arg Val Pro Tyr Pro Arg Pro Gly Met Cys Pro Ser Lys Thr Phe
 370 375 380

Gly Thr Phe Ser Ser Thr Lys Asp Phe Pro Asp Asp Val Ile Gln Phe
 385 390 395 400

Ala Arg Asn His Pro Leu Met Tyr Asn Ser Val Leu Pro Thr Gly Gly
 405 410 415

Arg Pro Leu Phe Leu Gln Val Gly Ala Asn Tyr Thr Phe Thr Gln Ile
 420 425 430

ES 2 620 487 T3

Ala Ala Asp Arg Val Ala Ala Ala Asp Gly His Tyr Asp Val Leu Phe
 435 440 445

Ile Gly Thr Asp Val Gly Thr Val Leu Lys Val Ile Ser Val Pro Lys
 450 455 460

Gly Ser Arg Pro Ser Ala Glu Gly Leu Leu Leu Glu Glu Leu His Val
 465 470 475 480

Phe Glu Asp Ser Ala Ala Val Thr Ser Met Gln Ile Ser Ser Lys Arg
 485 490 495

His Gln Leu Tyr Val Ala Ser Arg Ser Ala Val Ala Gln Ile Ala Leu
 500 505 510

His Arg Cys Ala Ala His Gly Arg Val Cys Thr Glu Cys Cys Leu Ala
 515 520 525

Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly Val Ala Cys Thr Arg Phe Gln
 530 535 540

Pro Ser Ala Lys Arg Arg Phe Arg Arg Gln Asp Val Arg Asn Gly Asp
 545 550 555 560

Pro Ser Thr Leu Cys Ser Gly Asp Ser Ser Arg Pro Ala Leu Leu Glu
 565 570 575

His Lys Val Phe Gly Val Glu Gly Ser Ser Ala Phe Leu Glu Cys Glu
 580 585 590

Pro Arg Ser Leu Gln Ala Arg Val Glu Trp Thr Phe Gln Arg Ala Gly
 595 600 605

Val Thr Ala His Thr Gln Val Leu Ala Glu Glu Arg Thr Glu Arg Thr
 610 615 620

Ala Arg Gly Leu Leu Leu Arg Arg Leu Arg Arg Arg Asp Ser Gly Val
 625 630 635 640

Tyr Leu Cys Ala Ala Val Glu Gln Gly Phe Thr Gln Pro Leu Arg Arg
 645 650 655

Leu Ser Leu His Val Leu Ser Ala Thr Gln Ala Glu Arg Leu Ala Arg
 660 665 670

Ala Glu Glu Ala Ala Pro Ala Ala Pro Pro Gly Pro Lys Leu Trp Tyr
 675 680 685

Arg Asp Phe Leu Gln Leu Val Glu Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala Asn
 690 695 700

Ser Leu Arg Met Cys Arg Pro Gln Pro Ala Leu Gln Ser Leu Pro Leu

ES 2 620 487 T3

Gln Leu Tyr Val Ser Ser Asn Glu Gly Val Ser Gln Val Ser Leu His
 500 505 510

Arg Cys His Ile Tyr Gly Thr Ala Cys Ala Asp Cys Cys Leu Ala Arg
 515 520 525

Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly His Ser Cys Ser Arg Phe Tyr Pro
 530 535 540

Thr Gly Lys Arg Arg Ser Arg Arg Gln Asp Val Arg His Gly Asn Pro
 545 550 555 560

Leu Thr Gln Cys Arg Gly Phe Asn Leu Lys Ala Tyr Arg Asn Ala Ala
 565 570 575

Glu Ile Val Gln Tyr Gly Val Lys Asn Asn Thr Thr Phe Leu Glu Cys
 580 585 590

Ala Pro Lys Ser Pro Gln Ala Ser Ile Lys Trp Leu Leu Gln Lys Asp
 595 600 605

Lys Asp Arg Arg Lys Glu Val Lys Leu Asn Glu Arg Ile Ile Ala Thr
 610 615 620

Ser Gln Gly Leu Leu Ile Arg Ser Val Gln Gly Ser Asp Gln Gly Leu
 625 630 635 640

Tyr His Cys Ile Ala Thr Glu Asn Ser Phe Lys Gln Thr Ile Ala Lys
 645 650 655

Ile Asn Phe Lys Val Leu Asp Ser Glu Met Val Ala Val Val Thr Asp
 660 665 670

Lys Trp Ser Pro Trp Thr Trp Ala Ser Ser Val Arg Ala Leu Pro Phe
 675 680 685

His Pro Lys Asp Ile Met Gly Ala Phe Ser His Ser Glu Met Gln Met
 690 695 700

Ile Asn Gln Tyr Cys Lys Asp Thr Arg Gln Gln His Gln Gln Gly Asp
 705 710 715 720

Glu Ser Gln Lys Met Arg Gly Asp Tyr Gly Lys Leu Lys Ala Leu Ile
 725 730 735

Asn Ser Arg Lys Ser Arg Asn Arg Arg Asn Gln Leu Pro Glu Ser
 740 745 750

<210> 29
 <211> 777
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

ES 2 620 487 T3

<400> 29

Met Asn Ala Asn Lys Asp Glu Arg Leu Lys Ala Arg Ser Gln Asp Phe
 1 5 10 15

His Leu Phe Pro Ala Leu Met Met Leu Ser Met Thr Met Leu Phe Leu
 20 25 30

Pro Val Thr Gly Thr Leu Lys Gln Asn Ile Pro Arg Leu Lys Leu Thr
 35 40 45

Tyr Lys Asp Leu Leu Leu Ser Asn Ser Cys Ile Pro Phe Leu Gly Ser
 50 55 60

Ser Glu Gly Leu Asp Phe Gln Thr Leu Leu Leu Asp Glu Glu Arg Gly
 65 70 75 80

Arg Leu Leu Leu Gly Ala Lys Asp His Ile Phe Leu Leu Ser Leu Val
 85 90 95

Asp Leu Asn Lys Asn Phe Lys Lys Ile Tyr Trp Pro Ala Ala Lys Glu
 100 105 110

Arg Val Glu Leu Cys Lys Leu Ala Gly Lys Asp Ala Asn Thr Glu Cys
 115 120 125

Ala Asn Phe Ile Arg Val Leu Gln Pro Tyr Asn Lys Thr His Ile Tyr
 130 135 140

Val Cys Gly Thr Gly Ala Phe His Pro Ile Cys Gly Tyr Ile Asp Leu
 145 150 155 160

Gly Val Tyr Lys Glu Asp Ile Ile Phe Lys Leu Asp Thr His Asn Leu
 165 170 175

Glu Ser Gly Arg Leu Lys Cys Pro Phe Asp Pro Gln Gln Pro Phe Ala
 180 185 190

Ser Val Met Thr Asp Glu Tyr Leu Tyr Ser Gly Thr Ala Ser Asp Phe
 195 200 205

Leu Gly Lys Asp Thr Ala Phe Thr Arg Ser Leu Gly Pro Thr His Asp
 210 215 220

His His Tyr Ile Arg Thr Asp Ile Ser Glu His Tyr Trp Leu Asn Gly
 225 230 235 240

Ala Lys Phe Ile Gly Thr Phe Phe Ile Pro Asp Thr Tyr Asn Pro Asp
 245 250 255

Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Arg Glu Ser Ser Gln Glu Gly Ser
 260 265 270

Thr Ser Asp Lys Thr Ile Leu Ser Arg Val Gly Arg Val Cys Lys Asn
 275 280 285

ES 2 620 487 T3

Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Leu Ile Asn Lys Trp Thr Thr Phe Leu
 290 295 300
 Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Ile Pro Gly Ser Asp Gly Ala Asp Thr
 305 310 315 320
 Tyr Phe Asp Glu Leu Gln Asp Ile Tyr Leu Leu Pro Thr Arg Asp Glu
 325 330 335
 Arg Asn Pro Val Val Tyr Gly Val Phe Thr Thr Thr Ser Ser Ile Phe
 340 345 350
 Lys Gly Ser Ala Val Cys Val Tyr Ser Met Ala Asp Ile Arg Ala Val
 355 360 365
 Phe Asn Gly Pro Tyr Ala His Lys Glu Ser Ala Asp His Arg Trp Val
 370 375 380
 Gln Tyr Asp Gly Arg Ile Pro Tyr Pro Arg Pro Gly Thr Cys Pro Ser
 385 390 395 400
 Lys Thr Tyr Asp Pro Leu Ile Lys Ser Thr Arg Asp Phe Pro Asp Asp
 405 410 415
 Val Ile Ser Phe Ile Lys Arg His Ser Val Met Tyr Lys Ser Val Tyr
 420 425 430
 Pro Val Ala Gly Gly Pro Thr Phe Lys Arg Ile Asn Val Asp Tyr Arg
 435 440 445
 Leu Thr Gln Ile Val Val Asp His Val Ile Ala Glu Asp Gly Gln Tyr
 450 455 460
 Asp Val Met Phe Leu Gly Thr Asp Ile Gly Thr Val Leu Lys Val Val
 465 470 475 480
 Ser Ile Ser Lys Glu Lys Trp Asn Met Glu Glu Val Val Leu Glu Glu
 485 490 495
 Leu Gln Ile Phe Lys His Ser Ser Ile Ile Leu Asn Met Glu Leu Ser
 500 505 510
 Leu Lys Gln Gln Gln Leu Tyr Ile Gly Ser Arg Asp Gly Leu Val Gln
 515 520 525
 Leu Ser Leu His Arg Cys Asp Thr Tyr Gly Lys Ala Cys Ala Asp Cys
 530 535 540
 Cys Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly Asn Ala Cys Ser
 545 550 555 560
 Arg Tyr Ala Pro Thr Ser Lys Arg Arg Ala Arg Arg Gln Asp Val Lys
 565 570 575

ES 2 620 487 T3

Tyr Gly Asp Pro Ile Thr Gln Cys Trp Asp Ile Glu Asp Ser Ile Ser
580 585 590

His Glu Thr Ala Asp Glu Lys Val Ile Phe Gly Ile Glu Phe Asn Ser
595 600 605

Thr Phe Leu Glu Cys Ile Pro Lys Ser Gln Gln Ala Thr Ile Lys Trp
610 615 620

Tyr Ile Gln Arg Ser Gly Asp Glu His Arg Glu Glu Leu Lys Pro Asp
625 630 635 640

Glu Arg Ile Ile Lys Thr Glu Tyr Gly Leu Leu Ile Arg Ser Leu Gln
645 650 655

Lys Lys Asp Ser Gly Met Tyr Tyr Cys Lys Ala Gln Glu His Thr Phe
660 665 670

Ile His Thr Ile Val Lys Leu Thr Leu Asn Val Ile Glu Asn Glu Gln
675 680 685

Met Glu Asn Thr Gln Arg Ala Glu His Glu Glu Gly Lys Val Lys Asp
690 695 700

Leu Leu Ala Glu Ser Arg Leu Arg Tyr Lys Asp Tyr Ile Gln Ile Leu
705 710 715 720

Ser Ser Pro Asn Phe Ser Leu Asp Gln Tyr Cys Glu Gln Met Trp His
725 730 735

Arg Glu Lys Arg Arg Gln Arg Asn Lys Gly Gly Pro Lys Trp Lys His
740 745 750

Met Gln Glu Met Lys Lys Lys Arg Asn Arg Arg His His Arg Asp Leu
755 760 765

Asp Glu Leu Pro Arg Ala Val Ala Thr
770 775

<210> 30

<211> 775

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Ala Ser Ala Gly His Ile Ile Thr Leu Leu Leu Trp Gly Tyr Leu
1 5 10 15

Leu Glu Leu Trp Thr Gly Gly His Thr Ala Asp Thr Thr His Pro Arg
20 25 30

Leu Arg Leu Ser His Lys Glu Leu Leu Asn Leu Asn Arg Thr Ser Ile
35 40 45

10

ES 2 620 487 T3

Phe His Ser Pro Phe Gly Phe Leu Asp Leu His Thr Met Leu Leu Asp
 50 55 60

Glu Tyr Gln Glu Arg Leu Phe Val Gly Gly Arg Asp Leu Val Tyr Ser
 65 70 75 80

Leu Ser Leu Glu Arg Ile Ser Asp Gly Tyr Lys Glu Ile His Trp Pro
 85 90 95

Ser Thr Ala Leu Lys Met Glu Glu Cys Ile Met Lys Gly Lys Asp Ala
 100 105 110

Gly Glu Cys Ala Asn Tyr Val Arg Val Leu His His Tyr Asn Arg Thr
 115 120 125

His Leu Leu Thr Cys Gly Thr Gly Ala Phe Asp Pro Val Cys Ala Phe
 130 135 140

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

Pro Arg Ser Glu Arg Gly Arg Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro Ser Ser
 165 170 175

Ser Phe Ile Ser Thr Leu Ile Gly Ser Glu Leu Phe Ala Gly Leu Tyr
 180 185 190

Ser Asp Tyr Trp Ser Arg Asp Ala Ala Ile Phe Arg Ser Met Gly Arg
 195 200 205

Leu Ala His Ile Arg Thr Glu His Asp Asp Glu Arg Leu Leu Lys Glu
 210 215 220

Pro Lys Phe Val Gly Ser Tyr Met Ile Pro Asp Asn Glu Asp Arg Asp
 225 230 235 240

Asp Asn Lys Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Lys Ala Leu Glu Ala Glu
 245 250 255

Asn Asn Ala His Ala Ile Tyr Thr Arg Val Gly Arg Leu Cys Val Asn
 260 265 270

Asp Val Gly Gly Gln Arg Ile Leu Val Asn Lys Trp Ser Thr Phe Leu
 275 280 285

Lys Ala Arg Leu Val Cys Ser Val Pro Gly Met Asn Gly Ile Asp Thr
 290 295 300

Tyr Phe Asp Glu Leu Glu Asp Val Phe Leu Leu Pro Thr Arg Asp His
 305 310 315 320

Lys Asn Pro Val Ile Phe Gly Leu Phe Asn Thr Thr Ser Asn Ile Phe

ES 2 620 487 T3

Ala Lys Val Ile Trp Phe Val Gln Lys Gly Arg Glu Thr Arg Lys Glu
610 615 620

Glu Val Lys Thr Asp Asp Arg Val Val Lys Met Asp Leu Gly Leu Leu
625 630 635 640

Phe Leu Arg Leu His Lys Ser Asp Ala Gly Thr Tyr Phe Cys Gln Thr
645 650 655

Val Glu His Ser Phe Val His Thr Val Arg Lys Ile Thr Leu Glu Val
660 665 670

Val Glu Glu Glu Lys Val Glu Asp Met Phe Asn Lys Asp Asp Glu Glu
675 680 685

Asp Arg His His Arg Met Pro Cys Pro Ala Gln Ser Ser Ile Ser Gln
690 695 700

Gly Ala Lys Pro Trp Tyr Lys Glu Phe Leu Gln Leu Ile Gly Tyr Ser
705 710 715 720

Asn Phe Gln Arg Val Glu Glu Tyr Cys Glu Lys Val Trp Cys Thr Asp
725 730 735

Arg Lys Arg Lys Lys Leu Lys Met Ser Pro Ser Lys Trp Lys Tyr Ala
740 745 750

Asn Pro Gln Glu Lys Lys Leu Arg Ser Lys Pro Glu His Tyr Arg Leu
755 760 765

Pro Arg His Thr Leu Asp Ser
770 775

<210> 31
<211> 785
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Met Leu Val Ala Gly Leu Leu Leu Trp Ala Ser Leu Leu Thr Gly Ala
1 5 10 15

Trp Pro Ser Phe Pro Thr Gln Asp His Leu Pro Ala Thr Pro Arg Val
20 25 30

Arg Leu Ser Phe Lys Glu Leu Lys Ala Thr Gly Thr Ala His Phe Phe
35 40 45

Asn Phe Leu Leu Asn Thr Thr Asp Tyr Arg Ile Leu Leu Lys Asp Glu
50 55 60

Asp His Asp Arg Met Tyr Val Gly Ser Lys Asp Tyr Val Leu Ser Leu
65 70 75 80

10

ES 2 620 487 T3

Asp Leu His Asp Ile Asn Arg Glu Pro Leu Ile Ile His Trp Ala Ala
 85 90 95
 Ser Pro Gln Arg Ile Glu Glu Cys Val Leu Ser Gly Lys Asp Val Asn
 100 105 110
 Gly Glu Cys Gly Asn Phe Val Arg Leu Ile Gln Pro Trp Asn Arg Thr
 115 120 125
 His Leu Tyr Val Cys Gly Thr Gly Ala Tyr Asn Pro Met Cys Thr Tyr
 130 135 140
 Val Asn Arg Gly Arg Arg Ala Gln Ala Thr Pro Trp Thr Gln Thr Gln
 145 150 155 160
 Ala Val Arg Gly Arg Gly Ser Arg Ala Thr Asp Gly Ala Leu Arg Pro
 165 170 175
 Met Pro Thr Ala Pro Arg Gln Asp Tyr Ile Phe Tyr Leu Glu Pro Glu
 180 185 190
 Arg Leu Glu Ser Gly Lys Gly Lys Cys Pro Tyr Asp Pro Lys Leu Asp
 195 200 205
 Thr Ala Ser Ala Leu Ile Asn Glu Glu Leu Tyr Ala Gly Val Tyr Ile
 210 215 220
 Asp Phe Met Gly Thr Asp Ala Ala Ile Phe Arg Thr Leu Gly Lys Gln
 225 230 235 240
 Thr Ala Met Arg Thr Asp Gln Tyr Asn Ser Arg Trp Leu Asn Asp Pro
 245 250 255
 Ser Phe Ile His Ala Glu Leu Ile Pro Asp Ser Ala Glu Arg Asn Asp
 260 265 270
 Asp Lys Leu Tyr Phe Phe Phe Arg Glu Arg Ser Ala Glu Ala Pro Gln
 275 280 285
 Ser Pro Ala Val Tyr Ala Arg Ile Gly Arg Ile Cys Leu Asn Asp Asp
 290 295 300
 Gly Gly His Cys Cys Leu Val Asn Lys Trp Ser Thr Phe Leu Lys Ala
 305 310 315 320
 Arg Leu Val Cys Ser Val Pro Gly Glu Asp Gly Ile Glu Thr His Phe
 325 330 335
 Asp Glu Leu Gln Asp Val Phe Val Gln Gln Thr Gln Asp Val Arg Asn
 340 345 350
 Pro Val Ile Tyr Ala Val Phe Thr Ser Ser Gly Ser Val Phe Arg Gly
 355 360 365

ES 2 620 487 T3

Ser Ala Val Cys Val Tyr Ser Met Ala Asp Ile Arg Met Val Phe Asn
 370 375 380

Gly Pro Phe Ala His Lys Glu Gly Pro Asn Tyr Gln Trp Met Pro Phe
 385 390 395 400

Ser Gly Lys Met Pro Tyr Pro Arg Pro Gly Thr Cys Pro Gly Gly Thr
 405 410 415

Phe Thr Pro Ser Met Lys Ser Thr Lys Asp Tyr Pro Asp Glu Val Ile
 420 425 430

Asn Phe Met Arg Ser His Pro Leu Met Tyr Gln Ala Val Tyr Pro Leu
 435 440 445

Gln Arg Arg Pro Leu Val Val Arg Thr Gly Ala Pro Tyr Arg Leu Thr
 450 455 460

Thr Ile Ala Val Asp Gln Val Asp Ala Ala Asp Gly Arg Tyr Glu Val
 465 470 475 480

Leu Phe Leu Gly Thr Asp Arg Gly Thr Val Gln Lys Val Ile Val Leu
 485 490 495

Pro Lys Asp Asp Gln Glu Leu Glu Glu Leu Met Leu Glu Glu Val Glu
 500 505 510

Val Phe Lys Asp Pro Ala Pro Val Lys Thr Met Thr Ile Ser Ser Lys
 515 520 525

Arg Gln Gln Leu Tyr Val Ala Ser Ala Val Gly Val Thr His Leu Ser
 530 535 540

Leu His Arg Cys Gln Ala Tyr Gly Ala Ala Cys Ala Asp Cys Cys Leu
 545 550 555 560

Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly Gln Ala Cys Ser Arg Tyr
 565 570 575

Thr Ala Ser Ser Lys Arg Arg Ser Arg Arg Gln Asp Val Arg His Gly
 580 585 590

Asn Pro Ile Arg Gln Cys Arg Gly Phe Asn Ser Asn Ala Asn Lys Asn
 595 600 605

Ala Val Glu Ser Val Gln Tyr Gly Val Ala Gly Ser Ala Ala Phe Leu
 610 615 620

Glu Cys Gln Pro Arg Ser Pro Gln Ala Thr Val Lys Trp Leu Phe Gln
 625 630 635 640

Arg Asp Pro Gly Asp Arg Arg Arg Glu Ile Arg Ala Glu Asp Arg Phe
 645 650 655

ES 2 620 487 T3

Leu Arg Thr Glu Gln Gly Leu Leu Leu Arg Ala Leu Gln Leu Ser Asp
660 665 670

Arg Gly Leu Tyr Ser Cys Thr Ala Thr Glu Asn Asn Phe Lys His Val
675 680 685

Val Thr Arg Val Gln Leu His Val Leu Gly Arg Asp Ala Val His Ala
690 695 700

Ala Leu Phe Pro Pro Leu Ser Met Ser Ala Pro Pro Pro Pro Gly Ala
705 710 715 720

Gly Pro Pro Thr Pro Pro Tyr Gln Glu Leu Ala Gln Leu Leu Ala Gln
725 730 735

Pro Glu Val Gly Leu Ile His Gln Tyr Cys Gln Gly Tyr Trp Arg His
740 745 750

Val Pro Pro Ser Pro Arg Glu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Ser Pro Glu
755 760 765

Pro Gln Asp Gln Lys Lys Pro Arg Asn Arg Arg His His Pro Pro Asp
770 775 780

Thr
785

<210> 32

<211> 782

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Met Ala Pro Ser Ala Trp Ala Ile Cys Trp Leu Leu Gly Gly Leu Leu
1 5 10 15

Leu His Gly Gly Ser Ser Gly Pro Ser Pro Gly Pro Ser Val Pro Arg
20 25 30

Leu Arg Leu Ser Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Ala Asn Arg Ser Ala Ile
35 40 45

Phe Leu Gly Pro Gln Gly Ser Leu Asn Leu Gln Ala Met Tyr Leu Asp
50 55 60

Glu Tyr Arg Asp Arg Leu Phe Leu Gly Gly Leu Asp Ala Leu Tyr Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Asp Gln Ala Trp Pro Asp Pro Arg Glu Val Leu Trp Pro
85 90 95

Pro Gln Pro Gly Gln Arg Glu Glu Cys Val Arg Lys Gly Arg Asp Pro
100 105 110

10

ES 2 620 487 T3

Leu Thr Glu Cys Ala Asn Phe Val Arg Val Leu Gln Pro His Asn Arg
 115 120 125

Thr His Leu Leu Ala Cys Gly Thr Gly Ala Phe Gln Pro Thr Cys Ala
 130 135 140

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

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

Pro Phe Ala Ser Thr Phe Ile Asp Gly Glu Leu Tyr Thr Gly Leu Thr
 180 185 190

Ala Asp Phe Leu Gly Arg Glu Ala Met Ile Phe Arg Ser Gly Gly Pro
 195 200 205

Arg Pro Ala Leu Arg Ser Asp Ser Asp Gln Ser Leu Leu His Asp Pro
 210 215 220

Arg Phe Val Met Ala Ala Arg Ile Pro Glu Asn Ser Asp Gln Asp Asn
 225 230 235 240

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

Gly Ser Asn His Val Thr Val Ser Arg Val Gly Arg Val Cys Val Asn
 260 265 270

Asp Ala Gly Gly Gln Arg Val Leu Val Asn Lys Trp Ser Thr Phe Leu
 275 280 285

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

His Phe Asp Gln Leu Glu Asp Val Phe Leu Leu Trp Pro Lys Ala Gly
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Glu Val Tyr Ala Leu Phe Ser Thr Val Ser Ala Val Phe
 325 330 335

Gln Gly Phe Ala Val Cys Val Tyr His Met Ala Asp Ile Trp Glu Val
 340 345 350

Phe Asn Gly Pro Phe Ala His Arg Asp Gly Pro Gln His Gln Trp Gly
 355 360 365

Pro Tyr Gly Gly Lys Val Pro Phe Pro Arg Pro Gly Val Cys Pro Ser
 370 375 380

Lys Met Thr Ala Gln Pro Gly Arg Pro Phe Gly Ser Thr Lys Asp Tyr

ES 2 620 487 T3

Val Ile Val Ala Ser Gln Leu Asp Asn Leu Phe Pro Pro Glu Pro Lys
675 680 685

Pro Glu Glu Pro Pro Ala Arg Gly Gly Leu Ala Ser Thr Pro Pro Lys
690 695 700

Ala Trp Tyr Lys Asp Ile Leu Gln Leu Ile Gly Phe Ala Asn Leu Pro
705 710 715 720

Arg Val Asp Glu Tyr Cys Glu Arg Val Trp Cys Arg Gly Thr Thr Glu
725 730 735

Cys Ser Gly Cys Phe Arg Ser Arg Ser Arg Gly Lys Gln Ala Arg Gly
740 745 750

Lys Ser Trp Ala Gly Leu Glu Leu Gly Lys Lys Met Lys Ser Arg Val
755 760 765

His Ala Glu His Asn Arg Thr Pro Arg Glu Val Glu Ala Thr
770 775 780

<210> 33

<211> 2334

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5

<400> 33

```

atgaatgcta ataaagatga aagacttaaa gccagaagcc aagattttca cotttttcct      60
gctttgatga tgctaagcat gaccatgttg tttcttccag tcaactggcac ttggaagcaa      120
aatattccaa gactcaagct aacctacaaa gacttgctgc tttcaaatac ctgtattccc      180
tttttgggtt catcagaagg actggatttt caaactcttc tcttagatga ggaagaggc      240
aggctgctct tgggagccaa agaccacatc tttctactca gtctggttga cttaaacaaa      300
aattttaaga agatttattg gcttgctgca aaggaacggg tggaattatg taaattagct      360
gggaaagatg ccaatacaga atgtgcaaat ttcacagag tacttcagcc ctataacaaa      420
actcacatat atgtgtgtgg aactggagca tttcatccaa tatgtgggta tattgatctt      480
ggagtctaca aggaggatat tataattcaa ctagacacac ataatttggg gtctggcaga      540
ctgaaatgtc ctttcgatcc tcagcagcct tttgcttcag taatgacaga tgagtacctc      600
tactctggaa cagcttctga tttccttggc aaagatactg cattcactcg atcccctggg      660
cctactcatg accaccacta catcagaact gacatttcag agcactactg gctcaatgga      720
gcaaaattta ttggaacttt ctcatacca gacacctaca atccagatga tgataaata      780
tatttcttct ttcgtgaatc atctcaagaa ggcagtacct ccgataaac catcctttct      840
cgagttggaa gagtttgtaa gaatgatgta ggaggacaac gcagcctgat aaacaagtgg      900
acgacttttc ttaaggccag actgatttgc tcaattcctg gaagtgatgg gccagatact      960
tactttgatg agcttcaaga tttttattha ctccccacaa gagatgaaag aaatcctgta     1020
gtatatggag tctttactac aaccagctcc atcttcaaag gctctgctgt ttgtgtgat     1080
agcatggctg acatcagagc agtttttaat ggtccatgat ctcataagga aagtgcagac     1140

```

ES 2 620 487 T3

catcgttggg tgcagtatga tgggagaatt ccttatccac ggcctggtac atgtccaage 1200
 aaaacctatg acccactgat taagtcacc cgagattttc cagatgatgt catcagtttc 1260
 ataaagcggc actctgtgat gtataagtcc gtataccag ttgcaggagg accaacgttc 1320
 aagagaatca atgtggatta cagactgaca cagatagtg tggatcatgt cattgcagaa 1380
 gatggccagt acgatgtaat gtttcttggg acagacattg gaactgtcct caaagttgtc 1440
 agcatttcaa aggaaaagtg gaatatggaa gaggtagtgc tggaggagt gcagatattc 1500
 aagcactcat caatcatctt gaacatggaa ttgtctctga agcagcaaca attgtacatt 1560
 ggttcccag atggattggt tcagctctcc ttgcacagat ggcgacctta tgggaaagct 1620
 tgcgcagact gttgtcttgc cagagacccc tactgtgcct gggatggaaa tgcattgctc 1680
 cgatatgctc ctacttctaa aaggaaagct aagaacaag atgtaaaata tggcgacca 1740
 atcaccagat gctgggacat cgaagacagc attagtcatg aactgtctga tgaagagtg 1800
 atttttggca ttgaatttaa ctcaacctt ctggaatgta tacctaaatc ccaacaagca 1860
 actattaaat ggtatatcca gaggtcaggg gatgagcatc gagaggagt gaagcccgat 1920
 gaaagaatca tcaaacgga atatgggcta ctgattcga gtttgcagaa gaaggattct 1980
 gggatgtatt actgcaaac ccaggagcac actttcatcc acaccatagt gaagctgact 2040
 ttgaatgtca ttgagaatga acagatggaa aataccaga gggcagagca tgaggagggg 2100
 aagggtcaagg atctattggc tgagtcacgg ttgagataca aagactacat ccaaatcctt 2160
 agcagcccaa acttcagcct cgaccagtac tgcgaacaga tgtggcacag ggagaagcgg 2220
 agcagagaa acaagggggg cccaagtgg aagcacatgc aggaaatgaa gaagaaacga 2280
 aatcgaagac atcacagaga cctggatgag ctccctagag ctgtagccac gtag 2334

<210> 34
 <211> 2328
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 34
 atggcatccg cggggcacat taccacctg ctctgtggg gttacttact ggagctttgg 60
 acaggaggtc atacagctga tactaccac cccgggttac gcctgtcaca taaagagctc 120
 ttgaatctga acagaacatc aatatttcat agcccttttg gatttcttga tctccatata 180
 atgctgctgg atgaatatca agagaggctc ttcgtgggag gcaggacct tgtatattcc 240
 ctgagcttgg agagaatcag tgacggctat aaagagatac actggccgag tacagctcta 300
 aaaatggaag aatgcataat gaagggaaa gatgcgggtg aatgtgcaaa ttatgttcgg 360
 gttttgcac actataaac gacacacctt ctgacctgtg gtactggagc ttttgatcca 420
 gtttgtcct tcatcagagt tggatatcat ttggaggatc ctctgtttca cctggaatca 480
 cccagatctg agagaggaag gggcagatgt ccttttgacc ccagctcctc cttcatctcc 540
 actttaattg gtagtgaatt gtttcttggg ctctacagt actactggag cagagacgct 600
 gcgatcttcc gcagcatggg gcgactggcc catatccgca ctgagcatga cgatgagcgt 660
 ctgttgaaag aaccaaatt tgtaggttca tacatgattc ctgacaatga agacagagat 720

10

ES 2 620 487 T3

gacaacaaag tatatttctt ttttactgag aaggcactgg aggcagaaaa caatgctcac 780
gcaatttaca ccagggctcg ggcactctgt gtgaatgatg taggagggca gagaatactg 840
gtgaataagt ggagcacttt cctaaaagcg agactcgttt gctcagtacc aggaatgaat 900
ggaattgaca catattttga tgaattagag gacgtttttt tgctacctac cagagatcat 960
aagaatccag tgatatttgg actctttaac actaccagta atatttttcg agggcatgct 1020
atatgtgtct atcacatgtc tagcattcgg gcagccttca acggaccata tgcacataag 1080
gaaggacctg aataccactg gtcagtctat gaaggaag tcccttatcc aaggcctggt 1140
tcttgtgcca gcaaaagtaa tggagggaga tacggaacca ccaaggacta tcctgatgat 1200
gccatccgat ttgcaagaag tcatccacta atgtaccagg ccataaaaacc tgcccataaa 1260
aaaccaatat tggtaaaaac agatggaaaa tataacctga acaaatagc agtagatcga 1320
gtggaagctg aggatggcca atatgacgct ttgtttattg ggacagataa tggaaattgtg 1380
ctgaaagtaa tcacaattta caaccaagaa atggaatcaa tggagaaggt aattctagaa 1440
gaacttcaga tattcaagga tccagttcct attatttcta tggagatttc ttcaaaacgg 1500
caacagctgt atattggatc tgcttctgct gtggctcaag tcagattcca tcaactgtgac 1560
atgtatgaa gtgcttgtgc tgactgctgc ctggctcag acccttactg tgctgggat 1620
ggcatatcct gctcccgyta ttaccaaca ggcacacatg caaaaaggaa gttcaagaaa 1680
caagatgttc gacatggaag tgcagctcag cagtgccttg gacaacagtt tgttggggat 1740
gctttggata agactgaaga acatctggct tatggcatag agaacaacag tactttgctg 1800
gaatgtaccc cacgatcttt acaagcgaag gttatctggt ttgtacagaa aggacgtgag 1860
acaagaaaag aggaggtgaa gacagatgac agagtgggta agatggacct tggtttactc 1920
ttcctaaggt tacacaaatc agatgctggg acctattttt gccagacagt agagcatagc 1980
tttgtccata cggtcgtaa aatcaccttg gaggtagtgg aagaggagaa agtcgaggat 2040
atgtttaaca aggacgatga ggaggacagg catcacagga tgccctgtcc tgctcagagt 2100
agcatctcgc aggggcaaaa accatggtac aaggaattct tcagactgat cggttatagc 2160
aacttcaga gagtgaaga atactgagc aaagtatggt gcacagatag aaagaggaaa 2220
aagcttaaaa tgtcaccctc caagtgaag tatgccaacc ctcaggaaaa gaagctcctg 2280
tccaaacctg agcattaccg cctgcccagg cacacgctgg actcctga 2328

<210> 35
5 <211> 2349
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35
atggcccccct cggcctgggc catttgctgg ctgctagggg gcctcctgct ccatgggggt 60
agctctggcc ccagccccgg ccccagtgtg cccgcctgc ggctctccta ccgagacctc 120
ctgtctgcca accgctctgc catctttctg ggccccagg gctccctgaa cctccaggcc 180
atgtacctag atgagtaccg agaccgctc tttctgggtg gcctggacgc cctctactct 240
10 ctgctggctgg accaggcctg gccagatccc cgggaggtcc tgtggccacc gcagccagga 300

ES 2 620 487 T3

cagagggagg agtgtgttcg aaaggaaga gatcctttga cagagtgcgc caacttcgtg 360
 cgggtgctac agcctcacia cgggaccac ctgctagcct gtggcactgg ggccttcag 420
 cccacctgtg ccctcatcac agttggccac cgtggggagc atgtgctcca cctggagcct 480
 ggcagtgtyg aaagtggccg ggggcggtgc cctcacgagc ccagccgtcc ctttgccagc 540
 acctcatag acggggagct gtacacgggt ctcaactgctg acttctctggg gcgagagggc 600
 atgatcttcc gaagtggagg tcctcggcca gctctgcggt ccgactctga ccagagtctc 660
 ttgcacgacc cccggtttgt gatggccgcc cggatccctg agaactctga ccaggacaat 720
 gacaaggtyt acttcttctt ctccgagagc gtcccctcgc ccgatggtgg ctcgaaacct 780
 gtcactgtca gccgcgtggg ccgctctctg gtgaatgatg ctgggggcca gcgggtgctg 840
 gtgaacaaat ggagcacttt cctcaaggcc aggctggtct gctcggtgcc cggccctggt 900
 ggtgccgaga cccactttga ccagctagag gatgtgttcc tgctgtggcc caaggccggg 960
 aagagcctcg aggtgtacgc gctgttcagc accgtcagty ccgtgttcca gggcttcgcc 1020
 gctctgtgtg accacatggc agacatctgg gaggttttca acgggccctt tgcccaccga 1080
 gatgggcctc agcaccagty gggggcctat gggggcaagg tgcccttccc tcgccctggc 1140
 gtgtgcccc acaagatgac cgcacagcca ggacggcctt ttggcagcac caaggactac 1200
 ccagatgagg tgctgcagtt tgcccagacc caccctccta tgttctggcc tgtgcggcct 1260
 cgacatggcc gccctgtcct tgtcaagacc cacctggccc agcagctaca ccagatcgtg 1320
 gtggaccgcy tggaggcaga ggatgggacc tacgatgtca ttttctctggg gactgactca 1380
 gggctctgtg tcaaagtcat cgctctccag gcagggggct cagctgaacc tgaggaagtg 1440
 gttctggagg agctccaggt gtttaagtyg ccaacaccta tcaccgaaat ggagatctct 1500
 gtcaaaaggc aaatgctata cgtgggctct cggctggtyg tggcccagct gcggctgcac 1560
 caatgtgaga cttacggcac tgctgtgca gagtgtgccc tggcccggga cccatactgt 1620
 gcctgggatg gtgcctcctg taccactac cggcccagcc ttggcaagcg caaattcaaa 1680
 aagcaggaca tccggcacgg caaccctgcc ctgcagtgcc tgggcccagag ccaggaagaa 1740
 gaggcagtyg gacttgtggc agccaccatg gtctacggca cggagcacia tagcacctt 1800
 ctggagtgcc tgcccagtc tcccaggtc gctgtgcgct ggctcttgca gaggccaggg 1860
 gatgaggggc ctgaccaggt gaagacggac gagcagtyt tgcacacgga gcgggggctg 1920
 ctgttccgca ggcttagccg tttcagtyg ggacacctaca cctgcaccac tctggagcat 1980
 ggcttctccc agactgtggt ccgcctggct ctggtgtyg ttgtggcctc acagctggac 2040
 aacctgttcc ctccggagcc aaagccagag gagccccag cccggggagg cctggcttcc 2100
 accccaccca aggcctgtya caaggacatc ctgcagctca ttggcttcgc caacctgccc 2160
 cgggtggatg agtactgtga gcgctgtgty tgcaggggca ccacggaatg ctcaggctgc 2220
 ttccggagcc ggagccgggg caagcagccc aggggcaaga gctgggaggg gctggagcta 2280
 ggcaagaaga tgaagagccg ggtgcatgcc ggcacaaatc ggacgccccg ggaggtggag 2340
 gccacgtag 2349

<210> 36
 <211> 777
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

ES 2 620 487 T3

<400> 36

Met Asn Ala Asn Lys Asp Glu Arg Leu Lys Ala Arg Ser Gln Asp Phe
 1 5 10 15

His Leu Phe Pro Ala Leu Met Met Leu Ser Met Thr Met Leu Phe Leu
 20 25 30

Pro Val Thr Gly Thr Leu Lys Gln Asn Ile Pro Arg Leu Lys Leu Thr
 35 40 45

Tyr Lys Asp Leu Leu Leu Ser Asn Ser Cys Ile Pro Phe Leu Gly Ser
 50 55 60

Ser Glu Gly Leu Asp Phe Gln Thr Leu Leu Leu Asp Glu Glu Arg Gly
 65 70 75 80

Arg Leu Leu Leu Gly Ala Lys Asp His Ile Phe Leu Leu Ser Leu Val
 85 90 95

Asp Leu Asn Lys Asn Phe Lys Lys Ile Tyr Trp Pro Ala Ala Lys Glu
 100 105 110

Arg Val Glu Leu Cys Lys Leu Ala Gly Lys Asp Ala Asn Thr Glu Cys
 115 120 125

Ala Asn Phe Ile Arg Val Leu Gln Pro Tyr Asn Lys Thr His Ile Tyr
 130 135 140

Val Cys Gly Thr Gly Ala Phe His Pro Ile Cys Gly Tyr Ile Asp Leu
 145 150 155 160

Gly Val Tyr Lys Glu Asp Ile Ile Phe Lys Leu Asp Thr His Asn Leu
 165 170 175

Glu Ser Gly Arg Leu Lys Cys Pro Phe Asp Pro Gln Gln Pro Phe Ala
 180 185 190

Ser Val Met Thr Asp Glu Tyr Leu Tyr Ser Gly Thr Ala Ser Asp Phe
 195 200 205

Leu Gly Lys Asp Thr Ala Phe Thr Arg Ser Leu Gly Pro Thr His Asp
 210 215 220

His His Tyr Ile Arg Thr Asp Ile Ser Glu His Tyr Trp Leu Asn Gly
 225 230 235 240

Ala Lys Phe Ile Gly Thr Phe Phe Ile Pro Asp Thr Tyr Asn Pro Asp
 245 250 255

ES 2 620 487 T3

Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Arg Glu Ser Ser Gln Glu Gly Ser
 260 265 270

Thr Ser Asp Lys Thr Ile Leu Ser Arg Val Gly Arg Val Cys Lys Asn
 275 280 285

Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Leu Ile Asn Lys Trp Thr Thr Phe Leu
 290 295 300

Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Ile Pro Gly Ser Asp Gly Ala Asp Thr
 305 310 315 320

Tyr Phe Asp Glu Leu Gln Asp Ile Tyr Leu Leu Pro Thr Arg Asp Glu
 325 330 335

Arg Asn Pro Val Val Tyr Gly Val Phe Thr Thr Thr Ser Ser Ile Phe
 340 345 350

Lys Gly Ser Ala Val Cys Val Tyr Ser Met Ala Asp Ile Arg Ala Val
 355 360 365

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

Gln Tyr Asp Gly Arg Ile Pro Tyr Pro Arg Pro Gly Thr Cys Pro Ser
 385 390 395 400

Lys Thr Tyr Asp Pro Leu Ile Lys Ser Thr Arg Asp Phe Pro Asp Asp
 405 410 415

Val Ile Ser Phe Ile Lys Arg His Ser Val Met Tyr Lys Ser Val Tyr
 420 425 430

Pro Val Ala Gly Gly Pro Thr Phe Lys Arg Ile Asn Val Asp Tyr Arg
 435 440 445

Leu Thr Gln Ile Val Val Asp His Val Ile Ala Glu Asp Gly Gln Tyr
 450 455 460

Asp Val Met Phe Leu Gly Thr Asp Ile Gly Thr Val Leu Lys Val Val
 465 470 475 480

Ser Ile Ser Lys Glu Lys Trp Asn Met Glu Glu Val Val Leu Glu Glu
 485 490 495

Leu Gln Ile Phe Lys His Ser Ser Ile Ile Leu Asn Met Glu Leu Ser
 500 505 510

Leu Lys Gln Gln Gln Leu Tyr Ile Gly Ser Arg Asp Gly Leu Val Gln
 515 520 525

Leu Ser Leu His Arg Cys Asp Thr Tyr Gly Lys Ala Cys Ala Asp Cys
 530 535 540

ES 2 620 487 T3

Cys Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly Asn Ala Cys Ser
545 550 555 560

Arg Tyr Ala Pro Thr Ser Lys Arg Lys Ala Lys Lys Gln Asp Val Lys
565 570 575

Tyr Gly Asp Pro Ile Thr Gln Cys Trp Asp Ile Glu Asp Ser Ile Ser
580 585 590

His Glu Thr Ala Asp Glu Lys Val Ile Phe Gly Ile Glu Phe Asn Ser
595 600 605

Thr Phe Leu Glu Cys Ile Pro Lys Ser Gln Gln Ala Thr Ile Lys Trp
610 615 620

Tyr Ile Gln Arg Ser Gly Asp Glu His Arg Glu Glu Leu Lys Pro Asp
625 630 635 640

Glu Arg Ile Ile Lys Thr Glu Tyr Gly Leu Leu Ile Arg Ser Leu Gln
645 650 655

Lys Lys Asp Ser Gly Met Tyr Tyr Cys Lys Ala Gln Glu His Thr Phe
660 665 670

Ile His Thr Ile Val Lys Leu Thr Leu Asn Val Ile Glu Asn Glu Gln
675 680 685

Met Glu Asn Thr Gln Arg Ala Glu His Glu Glu Gly Lys Val Lys Asp
690 695 700

Leu Leu Ala Glu Ser Arg Leu Arg Tyr Lys Asp Tyr Ile Gln Ile Leu
705 710 715 720

Ser Ser Pro Asn Phe Ser Leu Asp Gln Tyr Cys Glu Gln Met Trp His
725 730 735

Arg Glu Lys Arg Arg Gln Arg Asn Lys Gly Gly Pro Lys Trp Lys His
740 745 750

Met Gln Glu Met Lys Lys Lys Arg Asn Arg Arg His His Arg Asp Leu
755 760 765

Asp Glu Leu Pro Arg Ala Val Ala Thr
770 775

<210> 37

<211> 775

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Ala Ser Ala Gly His Ile Ile Thr Leu Leu Leu Trp Gly Tyr Leu
1 5 10 15

10

ES 2 620 487 T3

Leu Glu Leu Trp Thr Gly Gly His Thr Ala Asp Thr Thr His Pro Arg
 20 25 30
 Leu Arg Leu Ser His Lys Glu Leu Leu Asn Leu Asn Arg Thr Ser Ile
 35 40 45
 Phe His Ser Pro Phe Gly Phe Leu Asp Leu His Thr Met Leu Leu Asp
 50 55 60
 Glu Tyr Gln Glu Arg Leu Phe Val Gly Gly Arg Asp Leu Val Tyr Ser
 65 70 75 80
 Leu Ser Leu Glu Arg Ile Ser Asp Gly Tyr Lys Glu Ile His Trp Pro
 85 90 95
 Ser Thr Ala Leu Lys Met Glu Glu Cys Ile Met Lys Gly Lys Asp Ala
 100 105 110
 Gly Glu Cys Ala Asn Tyr Val Arg Val Leu His His Tyr Asn Arg Thr
 115 120 125
 His Leu Leu Thr Cys Gly Thr Gly Ala Phe Asp Pro Val Cys Ala Phe
 130 135 140
 Ile Arg Val Gly Tyr His Leu Glu Asp Pro Leu Phe His Leu Glu Ser
 145 150 155 160
 Pro Arg Ser Glu Arg Gly Arg Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro Ser Ser
 165 170 175
 Ser Phe Ile Ser Thr Leu Ile Gly Ser Glu Leu Phe Ala Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Asp Tyr Trp Ser Arg Asp Ala Ala Ile Phe Arg Ser Met Gly Arg
 195 200 205
 Leu Ala His Ile Arg Thr Glu His Asp Asp Glu Arg Leu Leu Lys Glu
 210 215 220
 Pro Lys Phe Val Gly Ser Tyr Met Ile Pro Asp Asn Glu Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 Asp Asn Lys Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Lys Ala Leu Glu Ala Glu
 245 250 255
 Asn Asn Ala His Ala Ile Tyr Thr Arg Val Gly Arg Leu Cys Val Asn
 260 265 270
 Asp Val Gly Gly Gln Arg Ile Leu Val Asn Lys Trp Ser Thr Phe Leu
 275 280 285
 Lys Ala Arg Leu Val Cys Ser Val Pro Gly Met Asn Gly Ile Asp Thr

ES 2 620 487 T3

290	295	300	
Tyr Phe Asp Glu Leu Glu Asp Val Phe Leu Leu Pro Thr Arg Asp His 305 310 315 320			
Lys Asn Pro Val Ile Phe Gly Leu Phe Asn Thr Thr Ser Asn Ile Phe 325 330 335			
Arg Gly His Ala Ile Cys Val Tyr His Met Ser Ser Ile Arg Ala Ala 340 345 350			
Phe Asn Gly Pro Tyr Ala His Lys Glu Gly Pro Glu Tyr His Trp Ser 355 360 365			
Val Tyr Glu Gly Lys Val Pro Tyr Pro Arg Pro Gly Ser Cys Ala Ser 370 375 380			
Lys Val Asn Gly Gly Arg Tyr Gly Thr Thr Lys Asp Tyr Pro Asp Asp 385 390 395 400			
Ala Ile Arg Phe Ala Arg Ser His Pro Leu Met Tyr Gln Ala Ile Lys 405 410 415			
Pro Ala His Lys Lys Pro Ile Leu Val Lys Thr Asp Gly Lys Tyr Asn 420 425 430			
Leu Lys Gln Ile Ala Val Asp Arg Val Glu Ala Glu Asp Gly Gln Tyr 435 440 445			
Asp Val Leu Phe Ile Gly Thr Asp Asn Gly Ile Val Leu Lys Val Ile 450 455 460			
Thr Ile Tyr Asn Gln Glu Met Glu Ser Met Glu Glu Val Ile Leu Glu 465 470 475 480			
Glu Leu Gln Ile Phe Lys Asp Pro Val Pro Ile Ile Ser Met Glu Ile 485 490 495			
Ser Ser Lys Arg Gln Gln Leu Tyr Ile Gly Ser Ala Ser Ala Val Ala 500 505 510			
Gln Val Arg Phe His His Cys Asp Met Tyr Gly Ser Ala Cys Ala Asp 515 520 525			
Cys Cys Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly Ile Ser Cys 530 535 540			
Ser Arg Tyr Tyr Pro Thr Gly Thr His Ala Lys Arg Lys Phe Lys Lys 545 550 555 560			
Gln Asp Val Arg His Gly Asn Ala Ala Gln Gln Cys Phe Gly Gln Gln 565 570 575			

ES 2 620 487 T3

Phe Val Gly Asp Ala Leu Asp Lys Thr Glu Glu His Leu Ala Tyr Gly
580 585 590

Ile Glu Asn Asn Ser Thr Leu Leu Glu Cys Thr Pro Arg Ser Leu Gln
595 600 605

Ala Lys Val Ile Trp Phe Val Gln Lys Gly Arg Glu Thr Arg Lys Glu
610 615 620

Glu Val Lys Thr Asp Asp Arg Val Val Lys Met Asp Leu Gly Leu Leu
625 630 635 640

Phe Leu Arg Leu His Lys Ser Asp Ala Gly Thr Tyr Phe Cys Gln Thr
645 650 655

Val Glu His Ser Phe Val His Thr Val Arg Lys Ile Thr Leu Glu Val
660 665 670

Val Glu Glu Glu Lys Val Glu Asp Met Phe Asn Lys Asp Asp Glu Glu
675 680 685

Asp Arg His His Arg Met Pro Cys Pro Ala Gln Ser Ser Ile Ser Gln
690 695 700

Gly Ala Lys Pro Trp Tyr Lys Glu Phe Leu Gln Leu Ile Gly Tyr Ser
705 710 715 720

Asn Phe Gln Arg Val Glu Glu Tyr Cys Glu Lys Val Trp Cys Thr Asp
725 730 735

Arg Lys Arg Lys Lys Leu Lys Met Ser Pro Ser Lys Trp Lys Tyr Ala
740 745 750

Asn Pro Gln Glu Lys Lys Leu Arg Ser Lys Pro Glu His Tyr Arg Leu
755 760 765

Pro Arg His Thr Leu Asp Ser
770 775

<210> 38

<211> 782

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ala Pro Ser Ala Trp Ala Ile Cys Trp Leu Leu Gly Gly Leu Leu
1 5 10 15

Leu His Gly Gly Ser Ser Gly Pro Ser Pro Gly Pro Ser Val Pro Arg
20 25 30

Leu Arg Leu Ser Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Ala Asn Arg Ser Ala Ile
35 40 45

10

ES 2 620 487 T3

Phe Leu Gly Pro Gln Gly Ser Leu Asn Leu Gln Ala Met Tyr Leu Asp
 50 55 60

Glu Tyr Arg Asp Arg Leu Phe Leu Gly Gly Leu Asp Ala Leu Tyr Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Asp Gln Ala Trp Pro Asp Pro Arg Glu Val Leu Trp Pro
 85 90 95

Pro Gln Pro Gly Gln Arg Glu Glu Cys Val Arg Lys Gly Arg Asp Pro
 100 105 110

Leu Thr Glu Cys Ala Asn Phe Val Arg Val Leu Gln Pro His Asn Arg
 115 120 125

Thr His Leu Leu Ala Cys Gly Thr Gly Ala Phe Gln Pro Thr Cys Ala
 130 135 140

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

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

Pro Phe Ala Ser Thr Phe Ile Asp Gly Glu Leu Tyr Thr Gly Leu Thr
 180 185 190

Ala Asp Phe Leu Gly Arg Glu Ala Met Ile Phe Arg Ser Gly Gly Pro
 195 200 205

Arg Pro Ala Leu Arg Ser Asp Ser Asp Gln Ser Leu Leu His Asp Pro
 210 215 220

Arg Phe Val Met Ala Ala Arg Ile Pro Glu Asn Ser Asp Gln Asp Asn
 225 230 235 240

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

Gly Ser Asn His Val Thr Val Ser Arg Val Gly Arg Val Cys Val Asn
 260 265 270

Asp Ala Gly Gly Gln Arg Val Leu Val Asn Lys Trp Ser Thr Phe Leu
 275 280 285

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

His Phe Asp Gln Leu Glu Asp Val Phe Leu Leu Trp Pro Lys Ala Gly
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Glu Val Tyr Ala Leu Phe Ser Thr Val Ser Ala Val Phe
 325 330 335

ES 2 620 487 T3

Gln Gly Phe Ala Val Cys Val Tyr His Met Ala Asp Ile Trp Glu Val
 340 345 350

Phe Asn Gly Pro Phe Ala His Arg Asp Gly Pro Gln His Gln Trp Gly
 355 360 365

Pro Tyr Gly Gly Lys Val Pro Phe Pro Arg Pro Gly Val Cys Pro Ser
 370 375 380

Lys Met Thr Ala Gln Pro Gly Arg Pro Phe Gly Ser Thr Lys Asp Tyr
 385 390 395 400

Pro Asp Glu Val Leu Gln Phe Ala Arg Ala His Pro Leu Met Phe Trp
 405 410 415

Pro Val Arg Pro Arg His Gly Arg Pro Val Leu Val Lys Thr His Leu
 420 425 430

Ala Gln Gln Leu His Gln Ile Val Val Asp Arg Val Glu Ala Glu Asp
 435 440 445

Gly Thr Tyr Asp Val Ile Phe Leu Gly Thr Asp Ser Gly Ser Val Leu
 450 455 460

Lys Val Ile Ala Leu Gln Ala Gly Gly Ser Ala Glu Pro Glu Glu Val
 465 470 475 480

Val Leu Glu Glu Leu Gln Val Phe Lys Val Pro Thr Pro Ile Thr Glu
 485 490 495

Met Glu Ile Ser Val Lys Arg Gln Met Leu Tyr Val Gly Ser Arg Leu
 500 505 510

Gly Val Ala Gln Leu Arg Leu His Gln Cys Glu Thr Tyr Gly Thr Ala
 515 520 525

Cys Ala Glu Cys Cys Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly
 530 535 540

Ala Ser Cys Thr His Tyr Arg Pro Ser Leu Gly Lys Arg Lys Phe Lys
 545 550 555 560

Lys Gln Asp Ile Arg His Gly Asn Pro Ala Leu Gln Cys Leu Gly Gln
 565 570 575

Ser Gln Glu Glu Glu Ala Val Gly Leu Val Ala Ala Thr Met Val Tyr
 580 585 590

Gly Thr Glu His Asn Ser Thr Phe Leu Glu Cys Leu Pro Lys Ser Pro
 595 600 605

Gln Ala Ala Val Arg Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Asp Glu Gly Pro
 610 615 620

ES 2 620 487 T3

Asp Gln Val Lys Thr Asp Glu Arg Val Leu His Thr Glu Arg Gly Leu
625 630 635 640

Leu Phe Arg Arg Leu Ser Arg Phe Asp Ala Gly Thr Tyr Thr Cys Thr
645 650 655

Thr Leu Glu His Gly Phe Ser Gln Thr Val Val Arg Leu Ala Leu Val
660 665 670

Val Ile Val Ala Ser Gln Leu Asp Asn Leu Phe Pro Pro Glu Pro Lys
675 680 685

Pro Glu Glu Pro Pro Ala Arg Gly Gly Leu Ala Ser Thr Pro Pro Lys
690 695 700

Ala Trp Tyr Lys Asp Ile Leu Gln Leu Ile Gly Phe Ala Asn Leu Pro
705 710 715 720

Arg Val Asp Glu Tyr Cys Glu Arg Val Trp Cys Arg Gly Thr Thr Glu
725 730 735

Cys Ser Gly Cys Phe Arg Ser Arg Ser Arg Gly Lys Gln Ala Arg Gly
740 745 750

Lys Ser Trp Ala Gly Leu Glu Leu Gly Lys Lys Met Lys Ser Arg Val
755 760 765

His Ala Glu His Asn Arg Thr Pro Arg Glu Val Glu Ala Thr
770 775 780

<210> 39

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de reconocimiento de pro-proteína convertasa

<400> 39

Arg Phe Arg Arg

1

<210> 40

15 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de reconocimiento de pro-proteína convertasa mutada

<400> 40

Lys Phe Lys Lys

1

REIVINDICACIONES

1. Una semaforina 3D que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% homóloga a la secuencia comp se indica en la SEQ ID NO: 29 para uso en el tratamiento del cáncer.
- 5 2. La semaforina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la semaforina se va a administrar sistemáticamente.
3. La semaforina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la semaforina se va a administrar localmente.
4. La semaforina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha semaforina 3D se une a un agente potenciador de liberación sostenida.
- 10 5. La semaforina para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el agente potenciador de liberación sostenida es ácido hialurónico (HA), ácido algínico (AA), metacrilato de polihidroxietilo (Poli-HEMA), polietilenglicol(PEG), glicina o poliisopropilacrilamida.
6. La semaforina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho cáncer es cáncer de mama, cáncer pancreático o cáncer de pulmón.

15

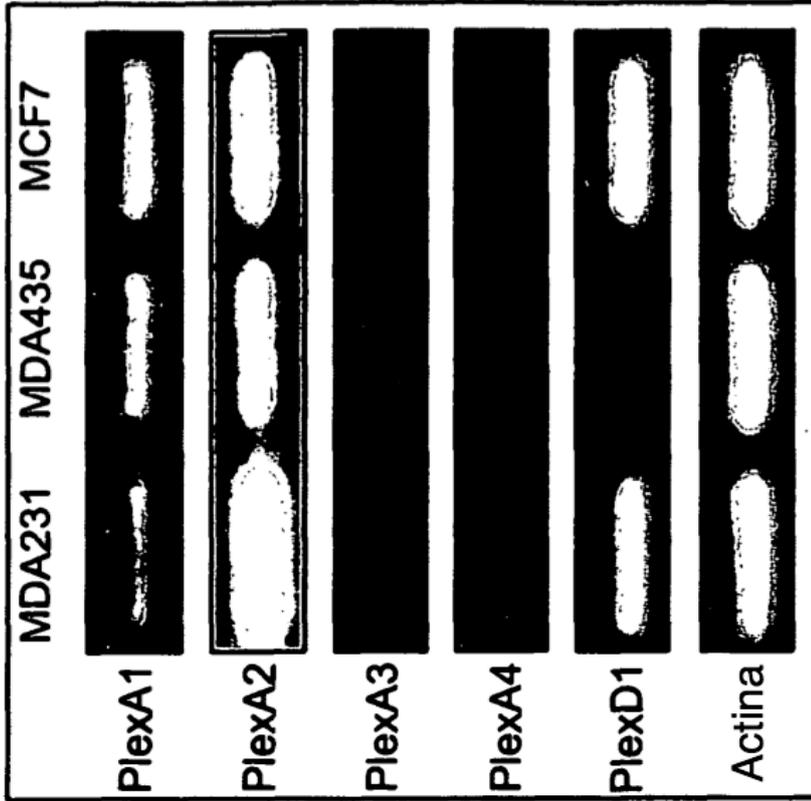


FIG. 1B

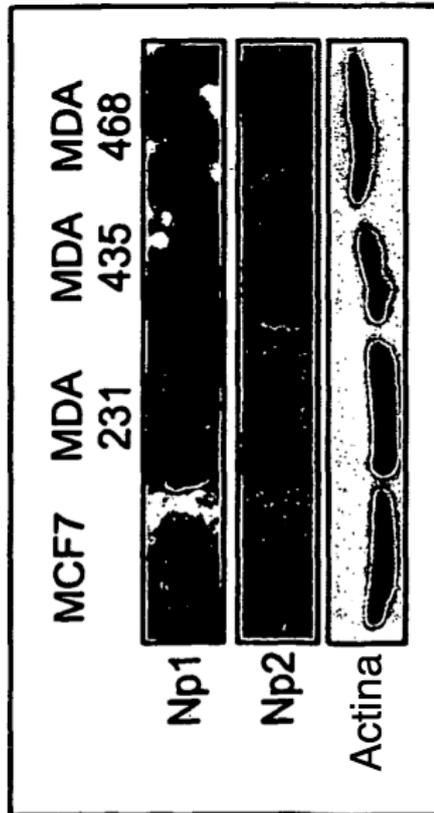


FIG. 1A

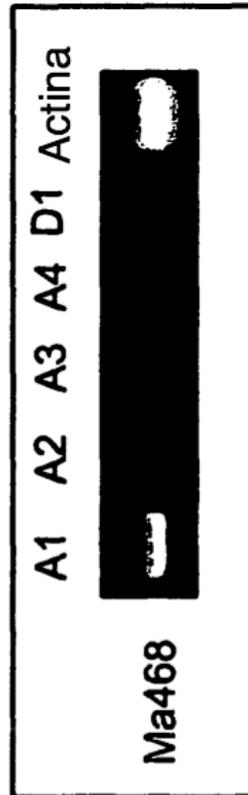


FIG. 1C



FIG. 2A

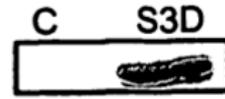


FIG.2D

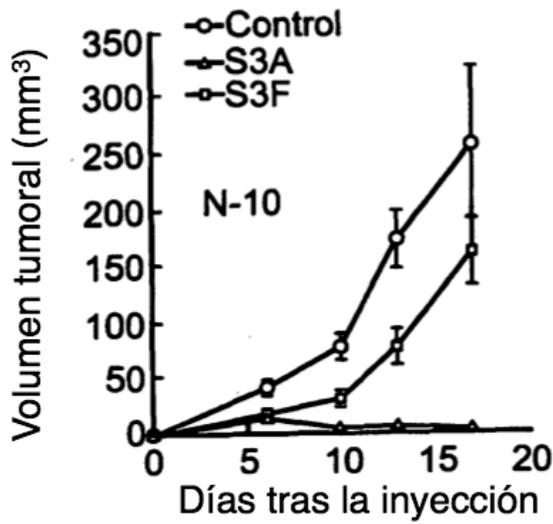


FIG.2B

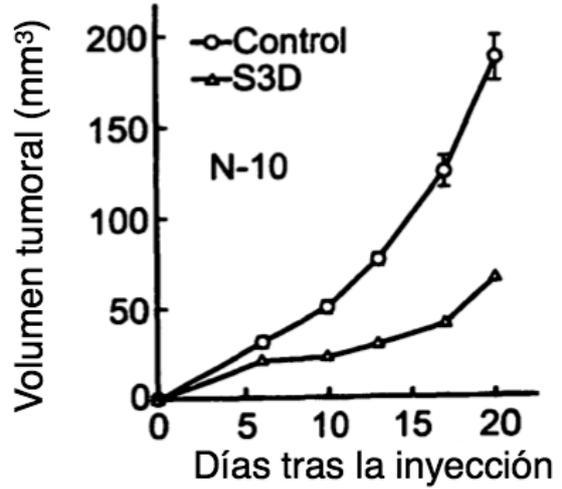


FIG. 2E

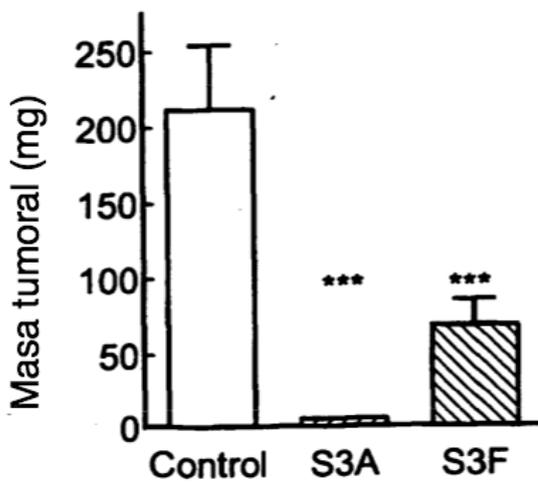


FIG.2C

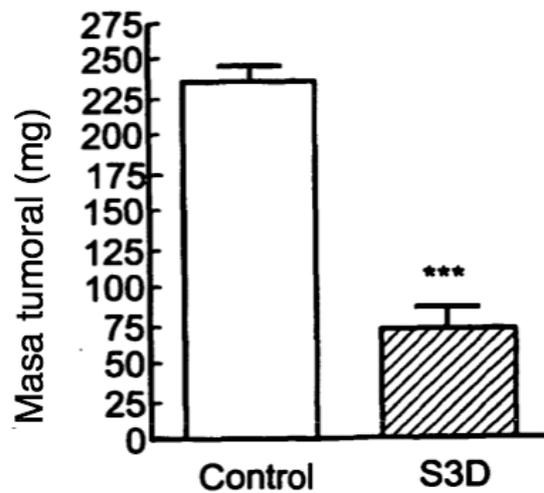


FIG.2F

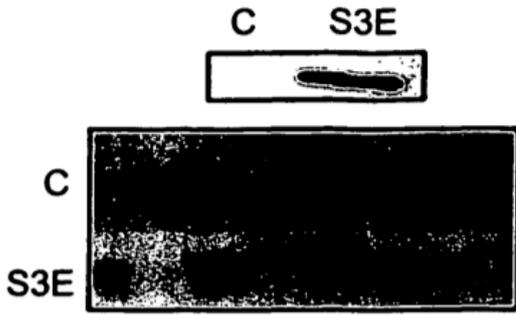


FIG.2G

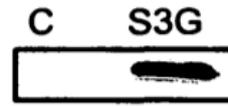
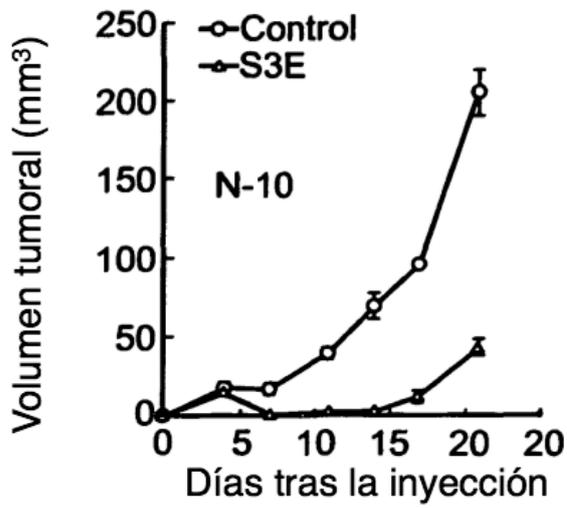


FIG.2J

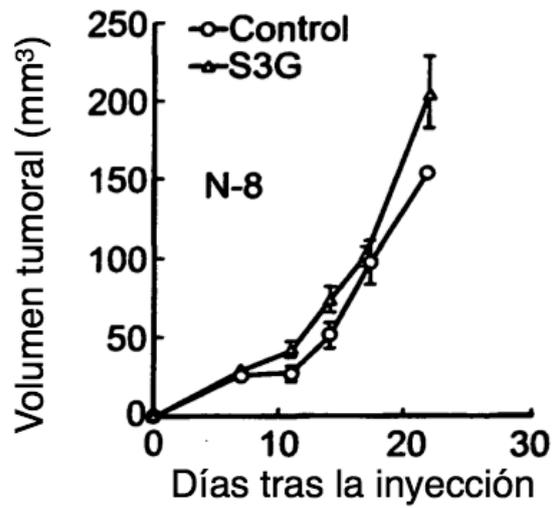


FIG.2H

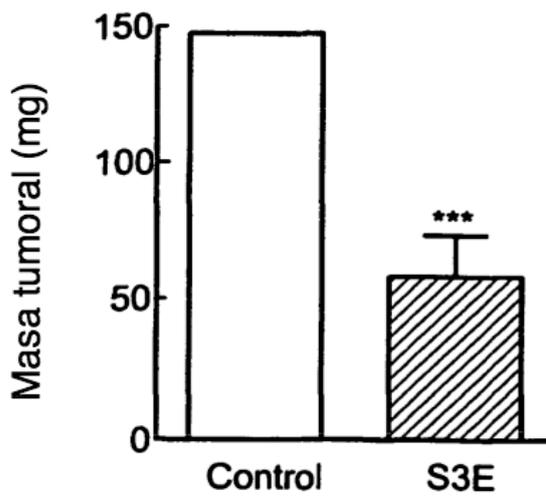


FIG.2I

FIG.2K

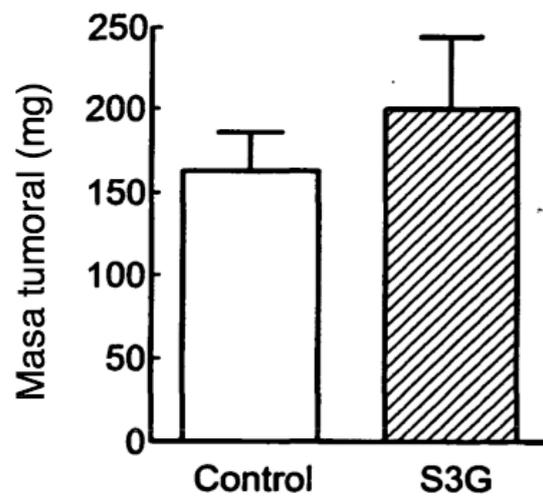


FIG.2L

FIG.3A

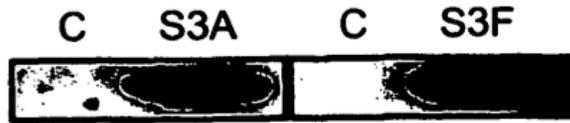


FIG.3B

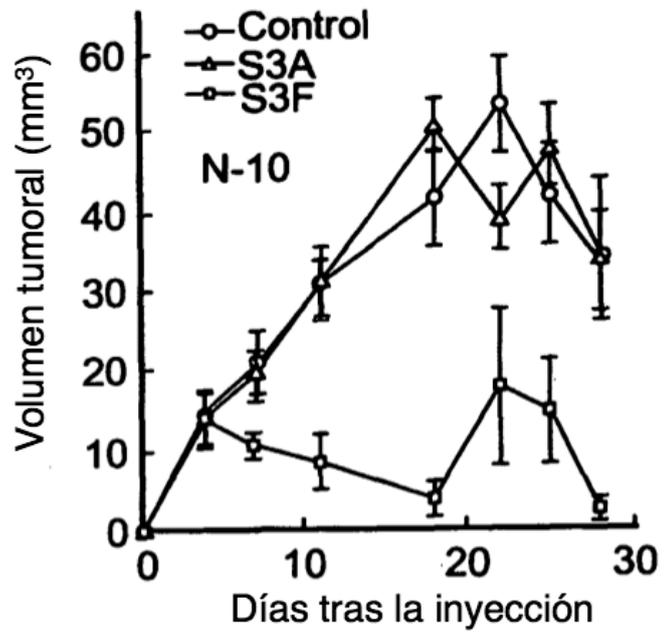


FIG.3C

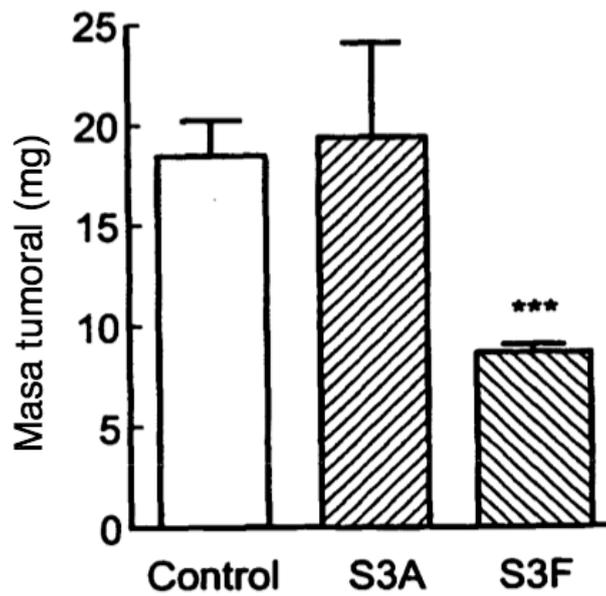


FIG.3D

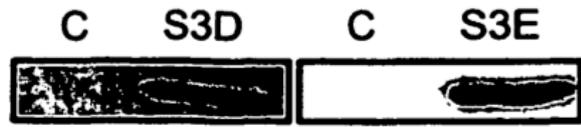


FIG.3E

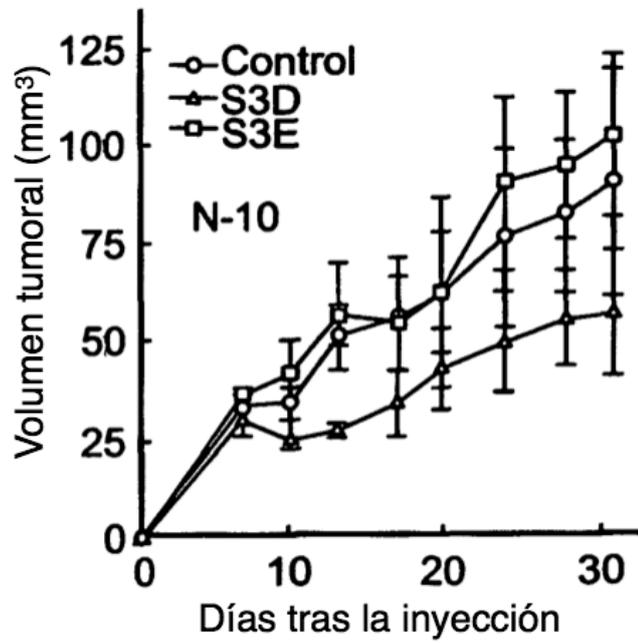


FIG.3F

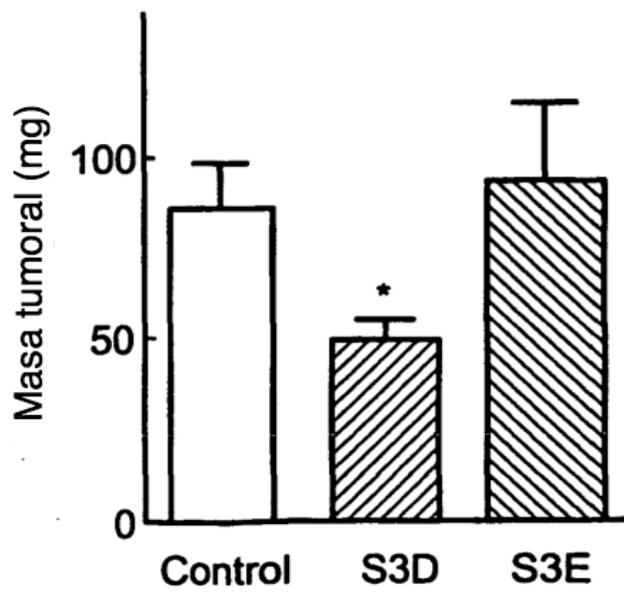


FIG.3G

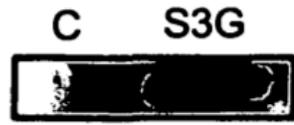


FIG.3H

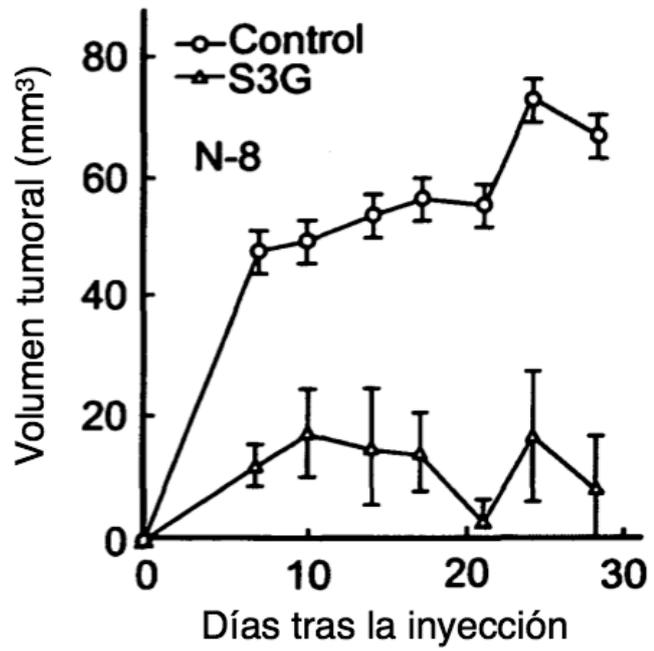


FIG.3I

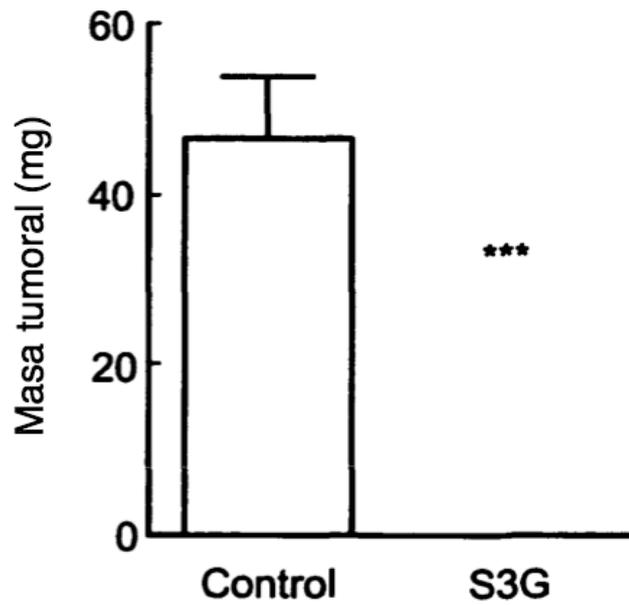


FIG. 4A



FIG. 4B

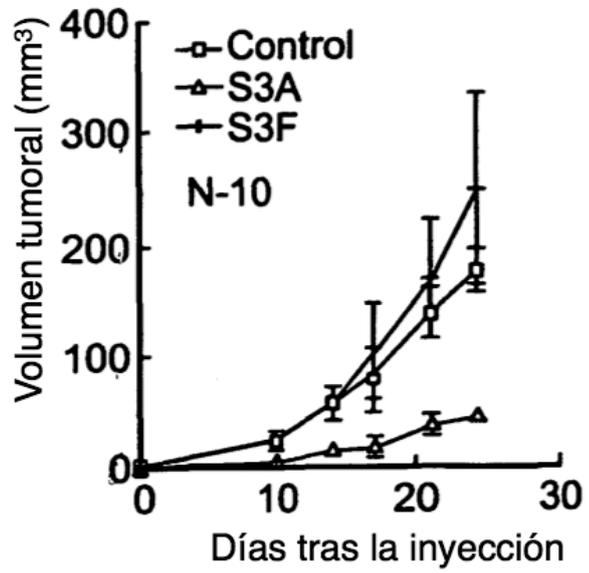


FIG. 4C

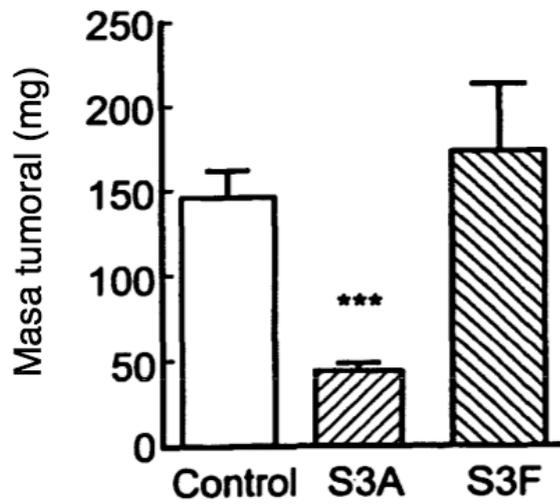


FIG. 4D



FIG. 4E

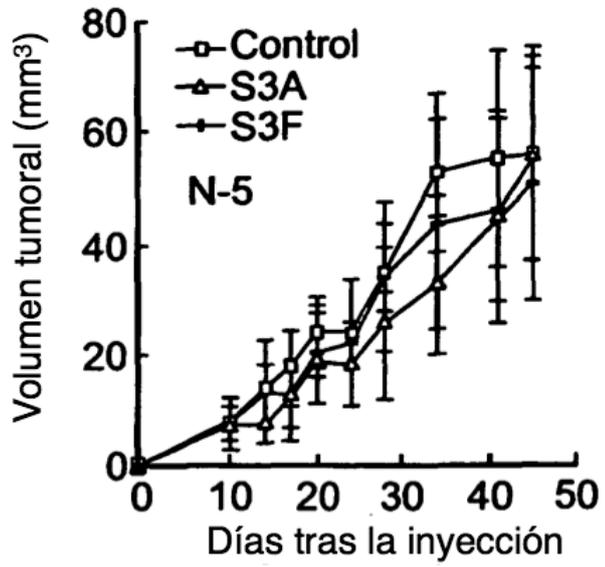
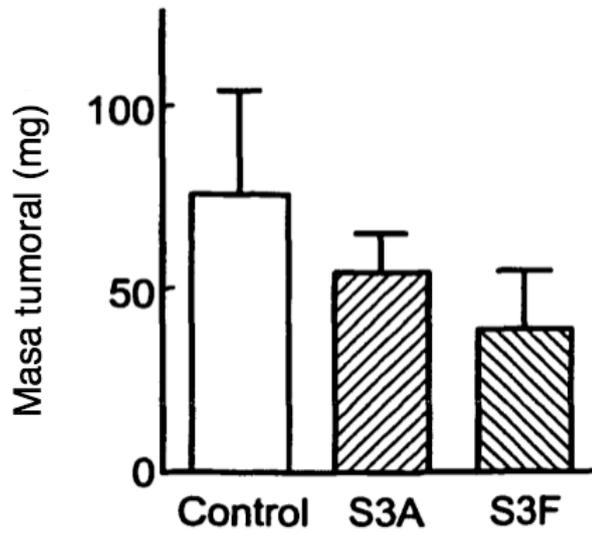


FIG. 4F



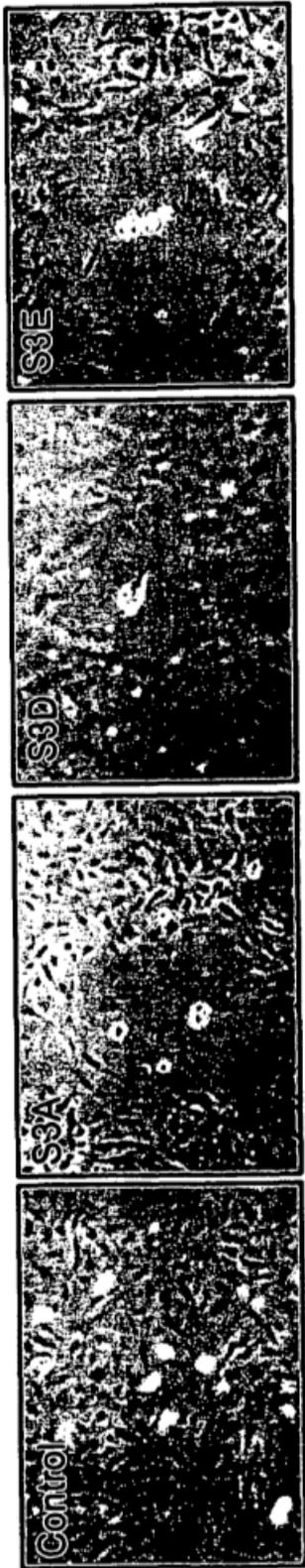


FIG. 5A



FIG. 5B

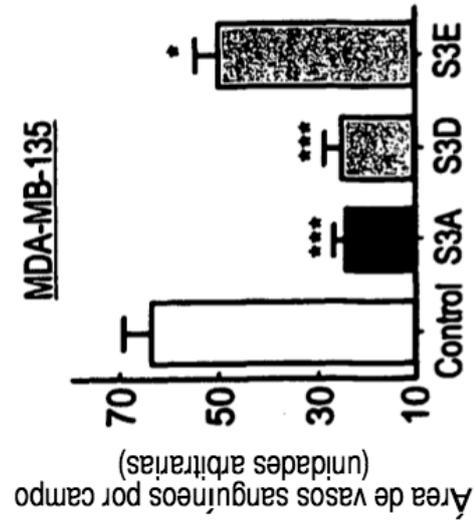


FIG. 5E

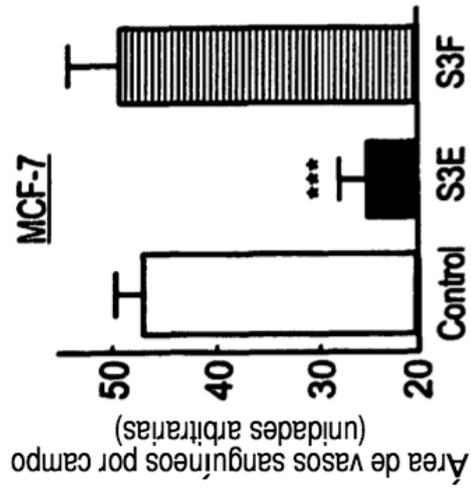


FIG. 5D

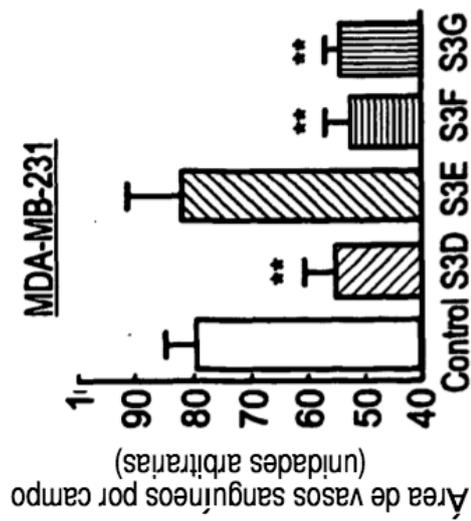


FIG. 5C

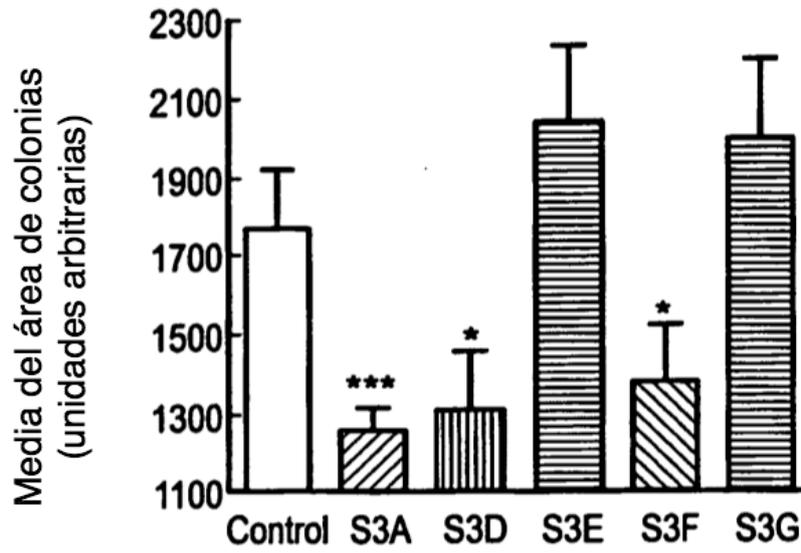


FIG.6A

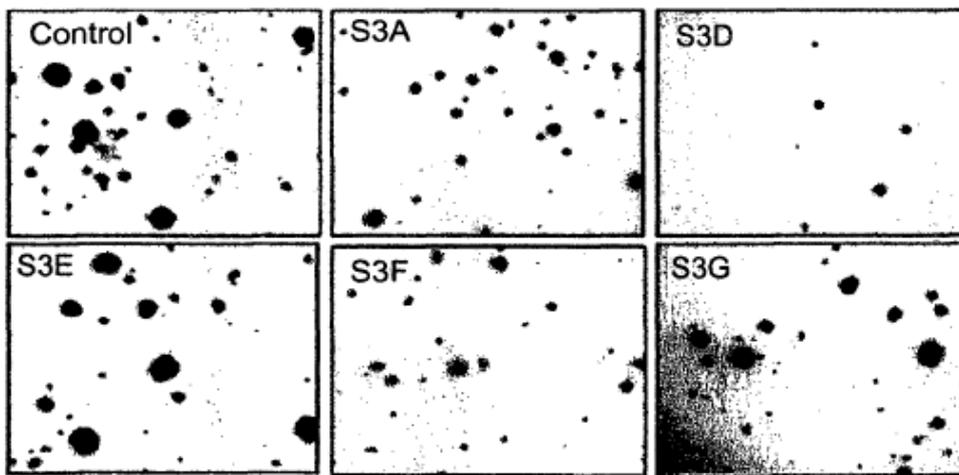


FIG.6B

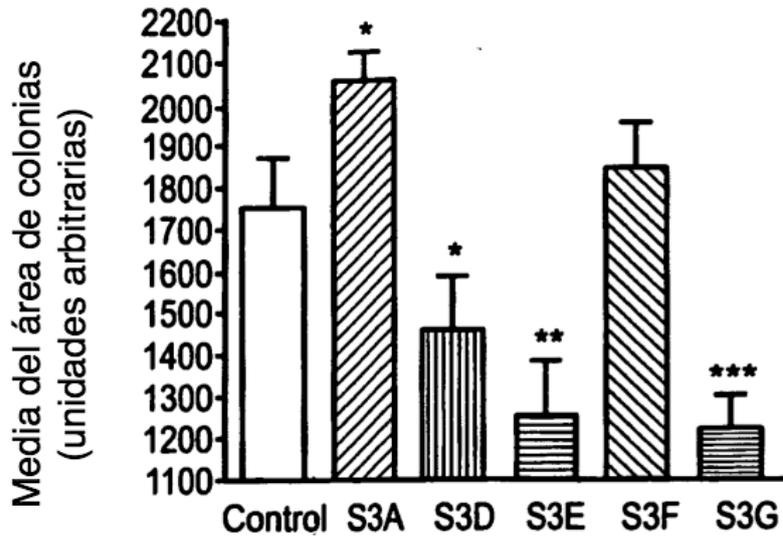


FIG. 6C

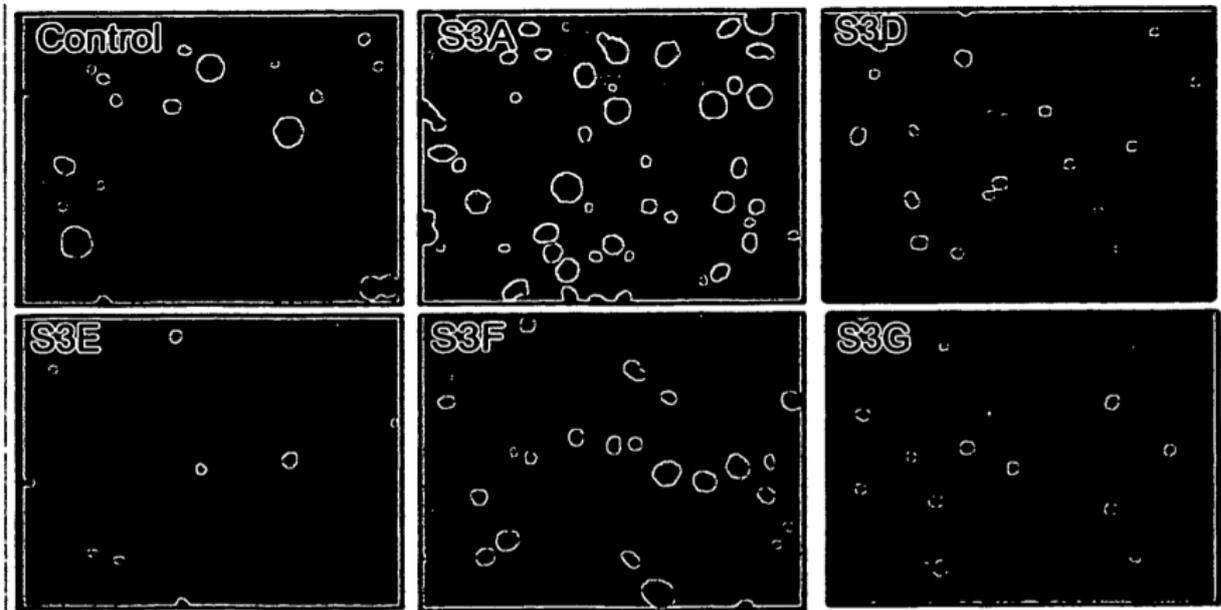


FIG. 6D

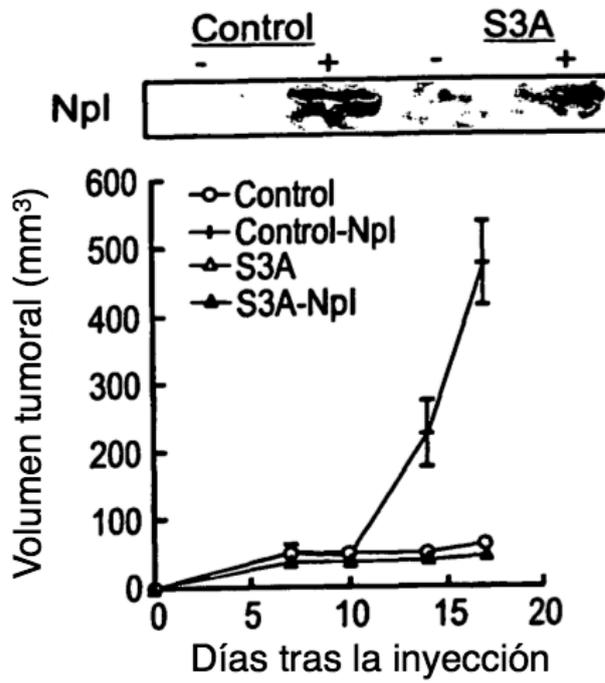


FIG. 7A

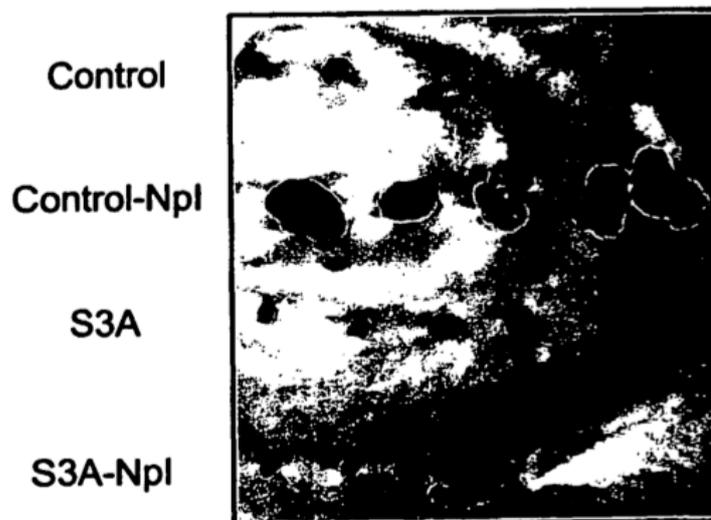


FIG.7B

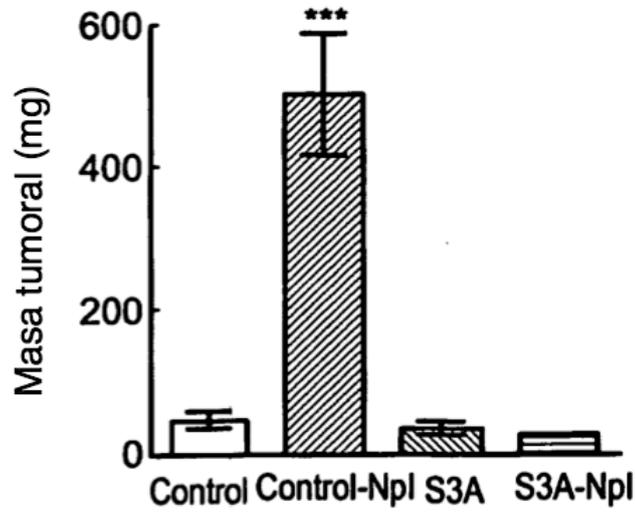


FIG. 7C

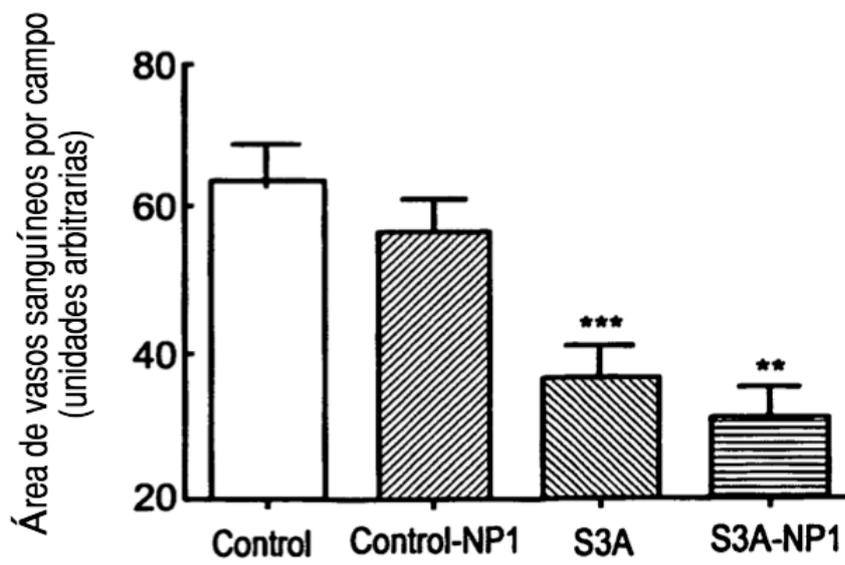


FIG.7D