

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 469**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2007** **E 11155518 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017** **EP 2371865**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a la proteína tirosina fosfatasa beta humana (HPTP-beta) y usos de los mismos**

30 Prioridad:

07.04.2006 US 790506 P

09.05.2006 US 798896 P

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

23.11.2017

73 Titular/es:

AERPIO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
9987 Carver Road, Suite 420
Cincinnati, OH 45242, US

72 Inventor/es:

ROTELLO, ROCCO JAMIE;
PETERS, KEVIN GENE y
DAVIS, MICHAEL GLEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 643 469 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que se unen a la proteína tirosina fosfatasa beta humana (HPTP-beta) y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a la proteína tirosina fosfatasa beta humana (HPTPbeta) y a usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 La angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente, desempeña un papel importante en una amplia selección de procesos fisiológicos y patológicos (Nguyen, L. L. *et al.*, *Int. Rev. Cytol*, 204, 1-48, (2001)). La angiogénesis es un proceso complejo, mediado por la comunicación entre las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos y su entorno. En las primeras etapas de la angiogénesis, las células tisulares o tumorales producen y secretan factores de crecimiento pro-angiogénicos en respuesta a estímulos ambientales tales como la hipoxia. Estos factores se difunden a las células endoteliales cercanas y estimulan receptores que conducen a la producción y secreción de proteasas que degradan la matriz extracelular circundante. Las células endoteliales activadas comienzan a migrar y proliferan en el tejido circundante hacia la fuente de estos factores de crecimiento (Bussolino, F., *Trends Biochem. Sci.*, 22, 251-256, (1997)). Las células endoteliales dejan de proliferar y se diferencian en estructuras tubulares, lo que es la primera etapa en la formación de vasos sanguíneos estables y maduros. Posteriormente, las células periendotheliales, tales como los pericitos y las células de músculo liso, son reclutadas al recipiente recién formado en una etapa adicional hacia la maduración del vaso.

20 La angiogénesis está regulada por un equilibrio de factores naturales proangiogénicos y antiangiogénicos. El factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento de fibroblastos y la angiopoyetina representan algunos de los muchos factores de crecimiento potencialmente proangiogénicos. Estos ligandos se unen a sus respectivas tirosina quinasas receptoras en la superficie de las células endoteliales y transducen señales que potencian la migración y la proliferación celulares. Aunque se han identificado muchos factores reguladores, todavía no se conocen por completo los mecanismos moleculares que impulsan este proceso.

25 Existen muchos estados patológicos impulsados por una angiogénesis persistente no regulada o regulada indebidamente. En dichos estados patológicos, la angiogénesis no regulada o regulada indebidamente puede causar una determinada enfermedad o agravar una afección patológica existente. Por ejemplo, la neovascularización ocular ha sido implicada como la causa más común de ceguera y subyace a la patología de aproximadamente 20 enfermedades oculares. En ciertas afecciones previamente existentes, tales como la artritis, los vasos sanguíneos capilares recién formados invaden las articulaciones y destruyen el cartílago. En la diabetes, nuevos capilares formados en la retina invaden el humor vítreo, causando sangrado y ceguera.

30 Tanto el crecimiento como la metástasis de los tumores sólidos también pueden depender de la angiogénesis, Folkman *et al.*, "Tumor Angiogenesis," capítulo 10, 206-32, en "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn *et al.*, eds., W. B. Saunders, (1995). Se ha demostrado que los tumores que aumentan hasta más de 2 mm de diámetro deben obtener su propio suministro de sangre y hacerlo induciendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares. Una vez incluidos estos nuevos vasos sanguíneos en el tumor, proporcionan nutrientes y factores de crecimiento esenciales para el crecimiento tumoral, así como un medio para que las células tumorales entren en la circulación y metastaticen a sitios distantes, tales como el hígado, el pulmón o el hueso (Weidner, *New Eng. J. Med.*, 324, 1, 1-8 (1991)). Cuando se usan como fármacos en animales portadores de tumores, los inhibidores naturales de la angiogénesis pueden prevenir el crecimiento de tumores pequeños (O'Reilly *et al.*, *Cell*, 79, 315-28 (1994)). En algunos protocolos, la aplicación de dichos inhibidores conduce a la regresión y a la latencia del tumor incluso una vez cesado el tratamiento (O'Reilly *et al.*, *Cell*, 88, 277-85 (1997)). Además, el suministro de inhibidores de la angiogénesis a ciertos tumores puede potenciar su respuesta a otros regímenes terapéuticos (véase, p. ej., Teischer *et al.*, *Int. J. Cancer*, 57, 920-25 (1994)).

45 Aunque muchos estados patológicos son impulsados por una angiogénesis persistente no regulada o regulada indebidamente, algunos estados patológicos pueden tratarse mejorando la angiogénesis. El crecimiento y la reparación de tejidos son eventos biológicos en donde se producen la proliferación celular y la angiogénesis. Por lo tanto, un aspecto importante de la reparación de heridas es la revascularización del tejido dañado por la angiogénesis.

50 Las heridas crónicas no cicatrizantes son una causa importante de morbilidad prolongada en la población humana envejecida. Esto es el caso, en especial, en los pacientes acamados o diabéticos que desarrollan úlceras cutáneas graves y no cicatrizantes. En muchos de estos casos, el retraso en la cicatrización es el resultado de un suministro sanguíneo inadecuado ya sea como resultado de la presión continua o del bloqueo vascular. Una mala circulación capilar debida a una aterosclerosis de arterias pequeñas o una estasis venosa contribuye a la falta de reparación del tejido dañado. Dichos tejidos se suelen infectar con microorganismos que proliferan sin exposición por los sistemas innatos de defensa del cuerpo que requieren tejido bien vascularizado para eliminar eficazmente los organismos patógenos. Como resultado de ello, la mayoría de la intervención terapéutica se centra en la restauración del flujo sanguíneo a los tejidos isquémicos, lo que permite que los nutrientes y factores inmunológicos accedan al sitio de la

herida.

Las lesiones ateroscleróticas en los grandes vasos pueden causar isquemia tisular que podría mejorarse modulando el crecimiento de los vasos sanguíneos hacia el tejido afectado. Por ejemplo, las lesiones ateroscleróticas en las arterias coronarias pueden causar angina e infarto de miocardio, que podrían prevenirse si se pudiera restablecer el flujo sanguíneo estimulando el crecimiento de las arterias colaterales. De manera similar, las lesiones ateroscleróticas en las grandes arterias que suministran las piernas pueden causar isquemia en el músculo esquelético que limite la movilidad y, en algunos casos, se requiere amputación, lo que también puede prevenirse mejorando el flujo sanguíneo con la terapia angiogénica.

Otras enfermedades tales como la diabetes y la hipertensión se caracterizan por una disminución en el número y en la densidad de pequeños vasos sanguíneos tales como las arteriolas y los capilares. Estos pequeños vasos sanguíneos son importantes para el suministro de oxígeno y nutrientes. Una disminución en el número y en la densidad de estos vasos contribuye a las consecuencias adversas de la hipertensión y la diabetes incluyendo claudicación, úlceras isquémicas, hipertensión acelerada e insuficiencia renal. Estos trastornos comunes y muchas otras dolencias menos comunes, tales como la enfermedad de Burgers, podrían mejorarse aumentando el número y la densidad de pequeños vasos sanguíneos usando la terapia angiogénica.

Por lo tanto, existe una necesidad continua de identificar reguladores de la angiogénesis.

En vista de lo anterior, existe la necesidad de identificar dianas bioquímicas en el tratamiento de trastornos mediados por la angiogénesis. Sin embargo, la angiogénesis implica la acción de múltiples factores de crecimiento y sus receptores tirosina quinasa (RTK) afines, (Yancopoulos *et al.*, *Nature*, 407,242-248, 2000). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), por ejemplo, es importante para la diferenciación de células endoteliales en vasos sanguíneos nacientes en la vasculatura embrionaria. Además, el VEGF mejora el desarrollo de los vasos sanguíneos en la vasculatura adulta. La administración de VEGF exógeno aumenta el desarrollo de la vasculatura colateral y mejora el flujo sanguíneo a los tejidos isquémicos.

Hasta la fecha, se han identificado tres RTK de VEGF, VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (KDR) y VEGFR3 (FLT-4). Aunque estos receptores están muy conservados, basados en la caracterización bioquímica y la actividad biológica, cada uno tiene funciones específicas y no superpuestas. De los tres receptores, se cree que VEGFR2 desempeña el papel predominante en la mediación de las acciones de VEGF en la vasculatura en desarrollo y durante la angiogénesis en adultos. Sin embargo, tanto VEGFR1 como VEGFR3 son necesarios para el desarrollo normal de la vasculatura embrionaria y también pueden ser importantes para la angiogénesis en tejidos adultos. Tras la unión y la dimerización de VEGF, un cambio conformacional en el dominio de quinasa de VEGFR2 aumenta su actividad de quinasa dando como resultado la "autofosforilación" del otro miembro del par en restos de tirosina específicos. Estas autofosforilaciones sirven para potenciar aún más la actividad quinasa y proporcionar puntos de anclaje para la asociación de moléculas de señalización intracelular.

Sin embargo, la activación de una sola vía angiogénica puede no ser suficiente para producir vasos persistentes y funcionales que proporcionen perfusión adecuada al tejido isquémico. Estos hallazgos, junto con el hecho de que múltiples RTK participan en el montaje de la vasculatura embrionaria, indican que las dianas bioquímicas que modulan múltiples vías angiogénicas tendrán ventajas frente a la administración de un solo factor de crecimiento.

Las proteínas tirosina fosfatasa (PTP) comprenden una gran familia de enzimas estrechamente relacionadas que desfosforilan proteínas que contienen restos de fosfotirosina. Las recientes evidencias sugieren que una función de las PTP es limitar la fosforilación y la activación de las RTK. Por ejemplo, se demostró que HCPTPA, una proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular, se asocia con VEGFR2 y regula negativamente su activación en células endoteliales cultivadas y su actividad biológica en ensayos de angiogénesis (Huang *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 38183- 38185, 1999).

Además de VEGFR2, la entrada de señalización de otra RTK, Tie-2, el receptor de las angiopoyetinas (Ang1 y Ang2), también es importante. La eliminación del gen Ang1 o Tie-2 en ratones puede producir letalidad embrionaria secundaria a anomalías en la vasculatura en desarrollo (Yancopoulos *et al.*, *Nature*, 407, 242-248, 2000). Además, la sobreexpresión de Ang1 en la piel aumenta la vascularización cutánea y la administración de Ang1 exógeno aumenta el flujo sanguíneo al músculo esquelético isquémico (Surf *et al.*, *Science*, 282, 468-471, 1998). Además, la inhibición de la activación de Tie-2 inhibe la angiogénesis y limita la progresión tumoral en modelos animales de cáncer (Lin *et al.*, *J Clin. Invest.*, 100, 2072-2078, 1997). Además de sus actividades angiogénicas, la activación de Tie-2 mediante administración exógena de Ang1 bloquea el flujo vascular mediado por VEGF y produce efectos proinflamatorios, pero aumenta sus efectos angiogénicos (Thurston *et al.*, *Nature Medicine*, 6, 460-463, 2000). Por lo tanto, las dianas biológicas que modulan la señalización tanto de VEGFR2 como de Tie-2 pueden producir terapias proangiogénicas o antiangiogénicas superiores.

Se ha sugerido la HPTPbeta (descrita por primera vez en Kruegar *et al.*, *EMBO J.*, 9, (1990)) para modular la actividad de la tirosina quinasa Tie-2 de tipo receptor de angiopoyetina, p. ej., documento WO 00/65085). También se sugiere HPTPbeta para regular las actividades de VEGFR2, p. ej., la publicación de patente de EE.UU. n.º 2004/0077065.

Sería deseable desarrollar anticuerpos, p. ej., un anticuerpo monoclonal humanizado, que regularan selectivamente la actividad de HPTPbeta y, de este modo, realizaran la señalización angiogénica, estimularan el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) y/o aumentarán el flujo sanguíneo en tejido isquémico o reducirán la señalización angiogénica, reducirán el crecimiento de los vasos sanguíneos y/o disminuirán el flujo sanguíneo al tejido afectado.

5 En la presente memoria, se describen anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a HPTPbeta y regulan la señalización celular angiogénica que, a su vez, regula la angiogénesis.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a la proteína tirosina fosfatasa beta humana HPTPbeta y, por lo tanto, regulan la señalización celular angiogénica que, a su vez, regula la angiogénesis.

10 La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado según la reivindicación 1 o a un fragmento de unión al antígeno aislado de un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 5. El anticuerpo y el fragmento de unión al antígeno se unen a la proteína fosfatasa tirosina beta humana, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo regula la señalización celular angiogénica que, a su vez, regula la angiogénesis.

15 La invención se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo que se une a la primera repetición FN3 de la proteína tirosina fosfatasa beta humana, en donde la primera repetición FN3 de la proteína tirosina fosfatasa beta humana tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.

20 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo en donde el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal R15E6 (hibridoma de ratón, células de bazo Balbc (linfocitos B) depositadas en la colección americana de cultivos tipo (ATCC), código postal 1549, Manassas, VA 20108 EE.UU., 4 de mayo de 2006, n.º de cesión de la ATCC PTA-7580).

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno está humanizado.

En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende residuos de la región de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal R15E6 y está humanizado.

25 En otra realización, la invención se refiere a un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal, en donde el fragmento comprende regiones variables de cadena pesada y ligera.

La invención se refiere a un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal, en donde el fragmento de unión al antígeno es un fragmento Fab.

30 También se describen en la presente memoria métodos de tratamiento de un trastorno regulado por la angiogénesis en un sujeto, que comprenden: identificar un sujeto que necesita la regulación de la angiogénesis; y administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a HPTPbeta y regula la angiogénesis.

35 También se describen métodos de tratamiento de un trastorno regulado por la angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno regulado por la angiogénesis es un trastorno elevado por angiogénesis, y se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, degeneración macular, cáncer, anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de la carótida, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía de la prematuridad, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, infecciones causantes de retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Best, miopía, fosas ópticas, enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento crónico de retina, síndrome de hiperviscosidad, toxoplasmosis, complicaciones posteriores al láser y a traumatismo, enfermedades asociadas con la rubeosis y vitreorretinopatía proliferativa.

40 También se describen métodos de tratamiento de un trastorno regulado por la angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno regulado por la angiogénesis es un trastorno elevado por angiogénesis y se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a, retinopatía diabética, degeneración macular, cáncer, artritis reumatoide, hemangiomas, enfermedad de Osier-Weber-Rendu o telangiectasia hemorrágica hereditaria, y tumores sólidos o de transmisión sanguínea.

45 También se describen métodos de un trastorno regulado por la angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno regulado por la angiogénesis es un trastorno elevado por angiogénesis, y se selecciona del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias intestinales tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, soriasis, sarcoidosis, artritis reumatoide, hemangiomas, enfermedad de Osier-Weber-Rendu o telangiectasia hemorrágica hereditaria, tumores sólidos o de transmisión sanguínea, y síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

50 También se describen métodos de tratamiento de un trastorno regulado por la angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno regulado por la angiogénesis es un trastorno reducido por angiogénesis, y se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a, isquemia de músculo esquelético o isquemia miocárdica, apoplejía, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad cerebrovascular, neuropatía diabética y cicatrización de heridas.

También se describen métodos de tratamiento de un trastorno regulado por la angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno regulado por la angiogénesis es un trastorno reducido por angiogénesis, y se selecciona del grupo que consiste en isquemia de músculo esquelético o isquemia miocárdica, apoplejía, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica, enfermedad de las arterias coronarias.

- 5 También se describen métodos de tratamiento de un trastorno reducido por angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno reducido por angiogénesis es enfermedad vascular periférica.

También se describen métodos de tratamiento de un trastorno reducido por angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno reducido por angiogénesis es enfermedad de las arterias coronarias.

- 10 También se describen en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden: un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden: un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana, en donde el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal R15E6; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden: un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que tiene las mismas, o esencialmente las mismas, características biológicas de R15E6; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 20 También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden: un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno está humanizado; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden: un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana, en donde el anticuerpo comprende residuos de la región de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal R15E6 y está humanizado; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 **Breve descripción de las figuras**

- 30 **Figura 1.** Diseño y producción de la proteína del ECD de HPTPβ. (Panel A) Representación esquemática de HPTPβ de longitud completa y de la proteína de fusión del dominio extracelular de HPTPβ-6His. (Panel B) La tinción con plata de Imidazol se eluye de una columna de Ni-NTA cargada con sobrenadante de células HEK293 transfectadas con un vector que dirige la expresión de βECD-6His. Se detecta una sola banda de alto peso molecular que coincide con la proteína del dominio extracelular de HPTPβ-6His.

- 35 **Figura 2.** R15E6 reconoce HPTPβ endógena en células endoteliales. (Panel A) Los lisados de células endoteliales se inmunoprecipitan con un anticuerpo de control (Carril 1), con R15E6 (Carril 2) o con una mezcla de anticuerpos anti-Tie2 y anti-VEGFR2 (Carril 3). Los inmunoprecipitados se resuelven mediante SDS-PAGE, se transfieren a una membrana de PVD y se sondan mediante transferencia Western con una mezcla de anticuerpos R15E6, anti-Tie2 y anti-VEGFR2. Se observa una sola banda principal de alto peso molecular que coincide con HPTPβ con R15E6 (Carril 2) y no con el anticuerpo de control (Carril 1) ni la mezcla de anti-Tie2 y anti-VEGFR2 (Carril 3). (Panel B) Las células endoteliales se someten a análisis FACS con R15E6 (pico blanco) o un control de anticuerpo no primario (pico negro). El cambio robusto en la fluorescencia indica que R15E6 se une a HPTPβ en la superficie de las células endoteliales intactas.

- 40 **Figura 3.** R15E6 mejora la activación del receptor de Tie2 en células HUVEC. La activación de Tie2 se mide en células endoteliales humanas como se describe en el Ejemplo 4. R15E6 aumenta de forma dependiente de la dosis la activación de Tie2 basal e inducida por Ang1.

- 45 **Figura 4.** R15E6 mejora la supervivencia de HUVEC. La supervivencia de células endoteliales humanas privadas de suero se mide como se describe en el Ejemplo 4. En consonancia con sus efectos sobre la activación de Tie2, R15E6 aumenta de forma dependiente de la dosis la supervivencia de las células endoteliales tanto basal como inducida por Ang1 (Panel A). Además, R15E6 también aumenta de forma dependiente de la dosis la supervivencia de las células endoteliales mediada por VEGF y por FGF (Paneles B y C). Un anticuerpo de control no mejora la supervivencia de las células endoteliales (Panel D).

- 50 **Figura 5.** R15E6 mejora la migración de HUVEC. La migración de células endoteliales humanas se mide como se describe en el Ejemplo 4. R15E6 aumenta de forma dependiente la migración de las células endoteliales tanto basal como inducida por VEGF.

Figura 6. R15E6 mejora la morfogénesis capilar en el ensayo de crecimiento de HUVEC/perlas. La morfogénesis capilar de las células endoteliales humanas se mide en el ensayo de crecimiento en perlas como se describe en el Ejemplo 4. R15E6 mejora la morfogénesis capilar de las células endoteliales tanto basal como inducida por VEGF.

Figura 7. El análisis de transferencia Western localiza el epítipo de unión a R15E6 en la repetición FN3 N-terminal del dominio extracelular de HPTPβ. (Panel A) Mediante análisis Western, R15E6 se une a todos los mutantes de truncamiento C-terminales demostrando que el epítipo de unión está situado en las 2 repeticiones FN3 N-terminales. (Panel B) El análisis de proteínas quiméricas de ratón/humanas localiza además el epítipo de unión a R15E6 en la repetición FN3 N-terminal de HPTPβ.

Figura 8. El análisis de MSD confirma la ubicación del epítipo de unión a R15E6 en la repetición FN3 N-terminal del dominio extracelular de HPTPβ. (Panel A) Mediante análisis de MSD, R15E6 se une a todos los mutantes de truncamiento C-terminales confirmando que el epítipo de unión está situado en las 2 repeticiones FN3 N-terminales. (Panel B) El análisis de proteínas quiméricas de ratón/humanas localiza además el epítipo de unión a R15E6 en la repetición FN3 N-terminal de HPTPβ.

Figura 9. El análisis de MSD demuestra que el fragmento Fab de R15E6 monovalente también se une a la repetición FN3 N-terminal de HPTPβ. (Panel A) Al igual que el anticuerpo R15E6 intacto, el fragmento Fab de R15E6 se une a todos los mutantes de truncamiento C-terminales, confirmando que el epítipo de unión está situado en las 2 repeticiones FN3 N-terminales. (Panel B) El análisis de proteínas quiméricas de ratón/humanas localiza además el epítipo de unión del fragmento Fab de R15E6 en la repetición FN3 N-terminal de HPTPβ.

Figura 10. El fragmento Fab de R15E6 monovalente no mejora la activación de Tie2 y bloquea la activación de Tie2 por el R15E6 intacto.

Figura 11. El fragmento Fab de R15E6 inhibe potentemente la supervivencia de las células endoteliales. (Panel A) En comparación con un fragmento Fab de control, el fragmento Fab de R15E6 inhibe potentemente la supervivencia de las células endoteliales. (Panel B) El efecto inhibitor del fragmento Fab de R15E6 se rescata por la competencia con el R15E6 intacto.

Figura 12. El fragmento Fab de R15E6 inhibe la migración de las células endoteliales mediada por VEGF.

Descripción del listado de secuencias

En la Tabla I, se muestran cada una de las secuencias de nucleótidos y de proteínas de la lista de secuencias, junto con el correspondiente número de acceso de Genbank o Derwent, según proceda, y las especies de las que derivan.

Tabla I

Descripción de la secuencia	SEQ ID NO: Nucleótido, Proteína	Especie	N.º de acceso del Genbank equivalente
Dominio extracelular de HPTPbeta con marcador de His y Gly	1, 2	<i>Homo Sapiens</i>	
Dominio extracelular de HPTPbeta de longitud completa	3	<i>Homo Sapiens</i>	X54131 NM_002837
1/2 (AA1-730, 8 FN3) 775 aa	4	<i>Homo Sapiens</i>	
1/4 (AA1-376, 4 FN3) 421 aa	5	<i>Homo Sapiens</i>	
1/8 (AA1-202, 2 FN3) 247 aa	6	<i>Homo Sapiens</i>	
ECD1 de longitud completa de ratón 632 aa	7	<i>Mus musculus</i>	NM_029928
Primera FN3 humana-1/2 de ratón	8	Quimera humana-de ratón	
Segunda FN3 humana-1/2 de ratón	9	Quimera humana-de ratón	
Dos primeras FN3 humanas-1/2 de ratón	10	Quimera humana-de ratón	
FN3 humana, primera repetición	11	<i>Homo sapiens</i>	

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a HPTPbeta y a usos de los mismos.

Se pueden usar técnicas convencionales para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos, y el cultivo y la transformación de tejidos (p. ej., electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación pueden realizarse según las especificaciones del fabricante o como se realizan comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. En general, las técnicas y los procedimientos se realizan según métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describen en varias referencias generales y más específicas que se citan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y las técnicas de laboratorio de, la química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica que se describen en la presente memoria son los que se conocen y se usan comúnmente en la técnica. Las técnicas convencionales se pueden usar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéuticas, y tratamiento de pacientes.

Se entenderá que los siguientes términos y expresiones, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

"Proteína" se usa en la presente memoria indistintamente con péptido y polipéptido. HPTPbeta es la proteína tirosina fosfatasa humana como se definió en el listado de secuencias. En algunas de las realizaciones, se usan diversos fragmentos de HPTPbeta. Los homólogos, ortólogos, fragmentos, variantes y mutantes de la proteína y del gen HPTPbeta, como se describe más adelante, se consideran dentro del alcance del término "HPTPbeta".

Por "fragmento" se entiende una parte de la secuencia de nucleótidos o proteínas. Los fragmentos pueden conservar la actividad biológica de la proteína nativa. Los fragmentos de una secuencia de nucleótidos también son útiles como sondas de hibridación y cebadores o para regular la expresión de un gen, p. ej., antisentido, ARNip o micro ARN. Una parte biológicamente activa puede prepararse mediante el aislamiento de una parte de una de las secuencias de nucleótidos de la invención, la expresión de la parte codificada (p. ej., mediante expresión recombinante *in vitro*) y la evaluación de la actividad de la proteína codificada.

Un experto en la técnica también reconocería que pueden ser útiles genes y proteínas de especies distintas de las enumeradas en el listado de secuencias, en particular, especies de vertebrados. Dichas especies incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, cobayas, conejos, perros, cerdos, cabras, vacas, monos, chimpancés, ovejas, hámster y pez cebra. Un experto en la técnica reconocerá además que mediante el uso de sondas de las secuencias de especies conocidas, se podrían obtener secuencias de ADNc o secuencias genómicas homólogas a la secuencia conocida de la misma o de especies alternativas mediante métodos de clonación conocidos. Dichos homólogos y ortólogos se contemplan como útiles en la práctica de la invención.

Por "variantes" se entiende secuencias similares. Por ejemplo, las variantes conservativas pueden incluir aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos de la invención. Se pueden identificar variantes alélicas naturales y variantes de corte y empalme con el uso de técnicas conocidas, p. ej., con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) y técnicas de hibridación. Para aislar ortólogos y homólogos, en general, se utilizan condiciones de hibridación rigurosas, dictadas por secuencias, longitud de secuencia, contenido de guanina + citosina (GC) y otros parámetros específicos. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, p. ej., las derivadas usando mutagénesis dirigida. Las variantes pueden contener secuencias adicionales del locus genómico solo o en combinación con otras secuencias. Las variantes pueden contener secuencias adicionales del locus genómico solo o en combinación con otras secuencias.

Las moléculas de la invención también incluyen proteínas truncadas y/o mutadas en donde las regiones de la proteína no requeridas para la unión al ligando o la señalización se han eliminado o modificado. De manera similar, se pueden mutar o modificar sus actividades de unión al ligando o señalización. Dichas mutaciones pueden implicar mutaciones no conservativas, eliminaciones o adiciones de aminoácidos o dominios proteicos. Las proteínas variantes pueden conservar o no la actividad biológica. Dichas variantes pueden proceder, p. ej., del polimorfismo genético o de la manipulación humana.

También se contemplan en la presente memoria proteínas de fusión. Usando métodos conocidos, un experto en la técnica sería capaz de fabricar proteínas de fusión de las proteínas de la invención; que, aunque diferentes de la forma nativa, pueden ser útiles. Por ejemplo, la pareja de fusión puede ser una secuencia polipeptídica de señal (o líder) que dirija junto con la traducción o después de la traducción la transferencia de la proteína desde su sitio de síntesis a otro sitio (p. ej., el líder del factor alfa de levadura). Como alternativa, puede añadirse para facilitar la purificación o la identificación de la proteína de la invención (p. ej., poli-His, péptido Flag o proteínas fluorescentes).

El término "antígeno" se refiere a una molécula o a una parte de una molécula capaz de unirse mediante un agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo, y además es capaz de ser usada en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.

- El término "epítopo" incluye cualquier determinante antigénico, preferiblemente un determinante polipeptídico, capaz de realizar la unión específica a una inmunoglobulina o a un receptor de linfocitos T. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítopos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas tales como aminoácidos, azúcares, lípidos, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítopo es una región de un antígeno que es unida por un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferiblemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. También se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando presenta mayor afinidad hacia el antígeno que otras moléculas relacionadas y/o no relacionadas.
- El término "anticuerpo" (Ab), como se emplea en la presente memoria, incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos monocatenarios, p. ej., anticuerpos de llama y camello, fragmentos de anticuerpo, p. ej., regiones variables y/o fragmentos de regiones constantes, siempre que presenten una actividad biológica deseada, p. ej., actividad de unión al antígeno. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa indistintamente con "anticuerpo" en la presente memoria.
- Un "anticuerpo aislado" es aquel que ha sido identificado y/o separado y/o recuperado de su entorno natural.
- La unidad básica de anticuerpo de cuatro cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J y contienen, por tanto, 10 sitios de unión al antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar conjuntos polivalentes que comprenden de 2 a 5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de cuatro cadenas, en general, es de aproximadamente 150 kilo Dalton (kDa). Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ , y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H , y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que determinados restos de aminoácidos forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y V_L juntos forma un solo sitio de unión al antígeno. Para consultar la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, p. ej., "Basic and Clinical Immunology", 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, 1994, página 71 y capítulo 6.
- Se puede asignar la cadena L de cualquier especie de vertebrado a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases basándose en las diferencias relativamente menores en la secuencia y la función de C_H , p. ej., los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.
- Los miembros de la familia *Camelidae*, p. ej., llama, camello y dromedarios, contienen un tipo único de anticuerpo, que carecen de cadenas ligeras y carecen además del dominio C_{H1} (Muyldermans, S., *Rev. Mol. Biotechnol.*, 74, 277-302 (2001)). La región variable de estos anticuerpos de cadena pesada se denominan V_{HH} o VHH, y constituyen el fragmento de unión al antígeno intacto disponible más pequeño (15 kDa) derivado de una inmunoglobulina funcional.
- El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media la unión al antígeno y define la especificidad de un determinado anticuerpo hacia su antígeno. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de la extensión de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones marco conservadas (FR) de 15 a 30 aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas "regiones hipervariables", que tienen cada una de 9 a 12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
- La expresión "región hipervariable" cuando se usa en la presente memoria se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable, en general, comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (p. ej., alrededor de

aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la V_L , y alrededor de aproximadamente 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en la V_H , Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable".

5 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo epítipo, es decir, un solo determinante antigénico. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminarse con otros anticuerpos. El adjetivo "monoclonal" no debe interpretarse como que es necesario que la producción del anticuerpo se realice mediante algún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse mediante la metodología de hibridomas o pueden prepararse usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, animales o vegetales eucariotas (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos fágicos, usando las técnicas disponibles, p. ej., Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991).

20 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una determinada especie o que pertenecen a una determinada clase o subclase de anticuerpos, mientras que el resto de la/s cadena/s son idénticas u homólogas a secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase la patente de EE.UU. n.º 4.816.567 y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81, 6851-6855 (1984)).

25 Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo multimérico, preferiblemente la región de unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, dímeros y trímeros de conjugados de Fab, Fv, scFv, minicuerpos; dia-, tria- y tetracuerpos; anticuerpos lineales (véase Hudson *et al.*, *Nature Med.* 9, 129-134 (2003)).

30 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de una cadena pesada y una cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que aportan los restos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que solo comprende tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno y, por lo tanto, se incluyen en la definición de Fv.

35 "Fv monocatenario" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una sola cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

40 Los términos "dia-, tria- y tetracuerpos" se refieren a pequeños fragmentos de anticuerpo preparados mediante la construcción de fragmentos sFv con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L , de manera que se obtiene el apareamiento entre cadenas, pero no dentro de las cadenas, de los dominios V, dando lugar a un fragmento multivalente.

45 La expresión "anticuerpo humanizado" o "anticuerpo humano" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera procedentes de una especie no humana (p. ej., un ratón), pero en los que se ha alterado al menos una parte de la secuencia de V_H y/o V_L para que sea más de "tipo humano", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en el que las secuencias CDR humanas se introducen en secuencias de V_H y V_L no humanas para reemplazar las correspondientes secuencias de CDR no humanas. Los medios para preparar anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados son conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. n.º 4.816.567 y 5.225.539). Un método de preparación de anticuerpos humanos emplea el uso de animales transgénicos tales como un ratón transgénico. Estos animales transgénicos contienen una parte sustancial del genoma productor de anticuerpos humanos insertado en su propio genoma, y la producción de los anticuerpos endógenos del propio animal se hace deficiente en la producción de anticuerpos. Los métodos de fabricación de dichos animales transgénicos son conocidos en la técnica. Dichos animales transgénicos pueden fabricarse usando la tecnología XenoMouse[®] o usando un enfoque de "minilocus". Los métodos de fabricación de XenoMouse[®] se describen en las patentes de EE.UU. n.º 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598 y 6.075.181. Los métodos de fabricación de animales transgénicos usando el enfoque de "minilocus" se describen en las patentes de EE.UU. n.º 5.545.807, 5.545.806 y 5.625.825, y en el documento WO 93/12227.

60 La humanización de un anticuerpo no humano se ha vuelto rutinaria en los últimos años, y ahora está dentro del conocimiento de un experto en la técnica. Varias compañías proporcionan servicios de fabricación de un anticuerpo

humanizado, p. ej., Xoma, Aries, Medarex, PDL y Cambridge Antibody Technologies. Los protocolos de humanización se describen ampliamente en la literatura técnica, p. ej., Kipriyanov y Le Gall, *Molecular Biotechnol.*, Vol. 26, pág. 39-60 (2004), Humana Press, Totowa, NJ; Lo, *Methods Mol. Biol.*, Vol. 248, pág. 135-159 (2004), Humana Press, Totowa, NJ; Wu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 294, 151-162 (1999).

5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse en líneas celulares distintas de las líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican anticuerpos particulares pueden usarse para la transformación de una célula hospedadora de mamífero adecuada mediante métodos conocidos para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora, incluyendo, p. ej., el empaquetado del polinucleótido en un virus (o en un vector vírico) y la transducción de una célula hospedadora con el virus (o vector), o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ilustra en las patentes de EE.UU. n.º 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. El procedimiento de transformación usado puede depender del hospedador que se vaya a transformar. Los métodos de introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son conocidos en la técnica e incluyen; pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del/de los polinucleótido/s en liposomas, mezcla de ácido nucleico con lípidos cargados positivamente y microinyección directa del ADN en núcleos.

20 Una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada, una región variable de cadena pesada, una región constante de cadena ligera o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo, o un fragmento del mismo en una combinación adecuada si se desea, se inserta en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligación convencionales. La región constante de cadena pesada o de cadena ligera del anticuerpo se puede añadir al extremo C de la región variable apropiada y se liga en un vector de expresión. El vector normalmente se selecciona para que sea funcional en la célula hospedadora empleada en particular (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedadora de manera que pueda producirse la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Para una revisión de los vectores de expresión, véase *Methods Enzymol.* vol. 185 (Goeddel, ed.), 1990, Academic Press.

25 Los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención se unen a HPTPbeta y regulan la angiogénesis. Como se definió anteriormente, el término anticuerpo se usa para denotar un fragmento de unión al antígeno. Los usos de dichos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno se describen mejor a continuación.

Ensayos de selección usando modelos *in vitro* e *in vivo* de angiogénesis

30 Los anticuerpos de la invención se pueden seleccionar en ensayos de angiogénesis que son conocidos en la técnica. Dichos ensayos incluyen ensayos *in vitro*, que miden los sustitutos del crecimiento de los vasos sanguíneos en células cultivadas o la formación de estructuras vasculares a partir de explantes tisulares, y ensayos *in vivo*, que miden el crecimiento de los vasos sanguíneos directa o indirectamente (Auerbach, R., *et al.* (2003). *Clin Chem* 49, 32-40, Vailhe, B., *et al.* (2001). *Lab Invest* 81, 439-452).

35 Modelos de angiogénesis *in vitro*

La mayoría de estos ensayos emplean células endoteliales cultivadas o explantes de tejido, y miden el efecto de agentes sobre respuestas de células "angiogénicas" o sobre la formación de estructuras de tipo capilar sanguíneo. Los ejemplos de ensayos de angiogénesis *in vitro* incluyen, pero no se limitan a, migración y proliferación de células endoteliales, formación de tubos capilares, crecimiento endotelial, el ensayo de explante de anillo aórtico y el ensayo de arco aórtico de pollo.

Modelos de angiogénesis *in vivo*

45 En estos ensayos, los agentes o anticuerpos se administran local o sistémicamente en presencia o ausencia de factores de crecimiento (es decir, VEGF o angiopoyetina 1) y se mide el crecimiento de los nuevos vasos sanguíneos mediante la observación directa o midiendo un marcador sustituto tal como el contenido de hemoglobina o un indicador fluorescente. Los ejemplos de angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, ensayo de membrana corioalantoica de pollo, ensayo de angiogénesis corneal y ensayo de tapón MATRIGEL™.

Tratamiento de los trastornos regulados por la angiogénesis

50 El término "regular" se define como en sus significados aceptados que aparecen en los diccionarios. Por lo tanto, el significado del término "regular" incluye, pero no se limita a, regular positiva o negativamente, fijar, ordenar o uniformizar, gobernar o dirigir mediante diversos medios. En un ejemplo, se puede usar un anticuerpo en un método para el tratamiento de un "trastorno elevado por angiogénesis" o "trastorno reducido por angiogénesis". Como se emplea en la presente memoria, un "trastorno elevado por angiogénesis" es aquel que implica angiogénesis no deseada o elevada en la manifestación biológica de la enfermedad, del trastorno y/o de la afección; en la cascada biológica que conduce al trastorno; o como un síntoma del trastorno. De igual manera, el "trastorno reducido por angiogénesis" es aquel que implica angiogénesis deseada o reducida en las manifestaciones biológicas. Esta "implicación" de la angiogénesis en un trastorno elevado/reducido por angiogénesis incluye, pero no se limita a, las siguientes:

(1) La angiogénesis como "causa" del trastorno o de la manifestación biológica, si el nivel de angiogénesis se eleva o reduce genéticamente, por infección, por autoinmunidad, traumatismo, causas biomecánicas, estilo de vida o por otras causas.

5 (2) La angiogénesis como parte de la manifestación observable de la enfermedad o del trastorno. Es decir, la enfermedad o el trastorno se puede medir en términos del aumento o de la reducción de la angiogénesis. Desde un punto de vista clínico, la angiogénesis indica la enfermedad; sin embargo, la angiogénesis no necesita ser el "sello distintivo" de la enfermedad o del trastorno.

10 (3) La angiogénesis es parte de la cascada bioquímica o celular que produce la enfermedad o el trastorno. En este sentido, la regulación de la angiogénesis puede interrumpir la cascada, y puede controlar la enfermedad. Los ejemplos no limitantes de trastornos regulados por la angiogénesis que pueden tratarse mediante la presente invención se describen más adelante en la presente memoria.

15 Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con la neovascularización retiniana/coroidea que incluyen, pero no se limitan a, retinopatía diabética, degeneración macular, cáncer, anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de la carótida, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía de la prematuridad, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, infecciones causantes de retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Best, miopía, fosas ópticas, enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento crónico de retina, síndrome de hiperviscosidad, toxoplasmosis, y complicaciones posteriores al láser y a traumatismo. Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades asociadas con la rubeosis (neovascularización del iris) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso incluyendo todas las formas de vitreorretinopatía proliferativa, asociadas o no a la diabetes.

25 Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con la inflamación crónica. Las enfermedades con síntomas de inflamación crónica incluyen enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, soriasis, sarcoidosis y artritis reumatoide. La angiogénesis es un elemento clave que estas enfermedades inflamatorias crónicas tienen en común. La inflamación crónica depende de la formación continua de crecimientos capilares para mantener un flujo de entrada de células inflamatorias. El flujo de entrada y la presencia de las células inflamatorias producen granulomas y, por lo tanto, mantienen el estado inflamatorio crónico. La inhibición de la angiogénesis por las composiciones y los métodos de la presente invención evitaría la formación de granulomas y aliviaría la enfermedad.

30 La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se caracterizan por la inflamación crónica y la angiogénesis en diversos sitios del tracto gastrointestinal. La enfermedad de Crohn se caracteriza por una inflamación granulomatosa crónica en todo el tracto gastrointestinal, que consiste en nuevos crecimientos de capilares rodeados por un cilindro de células inflamatorias. La prevención de la angiogénesis inhibe la formación de los crecimientos e impide la formación de granulomas. La enfermedad de Crohn se presenta como una enfermedad inflamatoria transmural crónica que afecta más comúnmente al íleon distal y al colon, pero también puede presentarse en cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano y el área perianal. En general, los pacientes con enfermedad de Crohn tienen diarrea crónica asociada con dolor abdominal, fiebre, anorexia, pérdida de peso e hinchazón abdominal. La colitis ulcerosa es también una enfermedad crónica, inespecífica, inflamatoria y ulcerosa que se origina en la mucosa colónica y se caracteriza por la presencia de diarrea sanguinolenta.

35 Las enfermedades inflamatorias intestinales también muestran manifestaciones extraintestinales tales como lesiones cutáneas. Dichas lesiones se caracterizan por inflamación y angiogénesis, y pueden presentarse en muchos sitios distintos del tracto gastrointestinal. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser capaces de tratar estas lesiones previniendo la angiogénesis, reduciendo así el flujo de entrada de células inflamatorias y la formación de lesiones.

40 La sarcoidosis es otra enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por ser un trastorno granulomatoso multisistémico. Los granulomas de esta enfermedad pueden formarse en cualquier parte del cuerpo y, por lo tanto, los síntomas dependen del sitio de los granulomas y de si la enfermedad se activa. Los granulomas son creados por los crecimientos de capilares angiogénicos, proporcionando un suministro constante de células inflamatorias.

45 Los anticuerpos de la presente invención también pueden tratar las afecciones inflamatorias crónicas asociadas con la soriasis. La soriasis, una enfermedad de la piel, es otra enfermedad crónica y recurrente que se caracteriza por pápulas y placas de diversos tamaños. La prevención de la formación de los nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener las lesiones características conduce al alivio de los síntomas.

50 La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la inflamación inespecífica de las articulaciones periféricas. Se cree que los vasos sanguíneos del revestimiento sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies reactivas del oxígeno que conducen al crecimiento del pannus y a la destrucción del cartílago. Los factores implicados en la angiogénesis pueden contribuir activamente al, y ayudar a mantener el, estado crónicamente inflamado de la artritis reumatoide. Otras enfermedades que se pueden tratar según la presente invención son

hemangiomas, enfermedad de Osier-Weber-Rendu, telangiectasia hemorrágica hereditaria, tumores sólidos o transmitidos por sangre y síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

5 Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar para tratar un "trastorno reducido por angiogénesis". Como se emplea en la presente memoria, un "trastorno reducido por angiogénesis" es aquel que la angiogénesis se consideraría beneficiosa para tratar una enfermedad, un trastorno y/o una afección. El trastorno se caracteriza por tejido que sufre o corre el riesgo de sufrir daño isquémico, infección y/o mala cicatrización, que se produce cuando el tejido se ve privado de un suministro adecuado de sangre oxigenada debido a una circulación inadecuada. Como se emplea en la presente memoria, se usa "tejido" en el sentido más amplio para incluir, pero sin limitación, los siguientes: tejido cardíaco tal como miocardio y ventrículos cardíacos; tejido eréctil; músculo esquelético; tejido neurológico tal como del cerebelo; órganos internos tales como el cerebro, el corazón, el páncreas, el hígado, el bazo y los pulmones; o zona generalizada del cuerpo tal como miembros enteros, un pie o apéndices distales tales como dedos de las manos o de los pies.

Métodos de vascularización del tejido isquémico

15 Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en un método de vascularización de tejido isquémico. Como se emplea en la presente memoria, "tejido isquémico" significa tejido que está privado de un flujo sanguíneo adecuado. Los ejemplos de tejido isquémico incluyen, pero no se limitan a, tejido que carece de suministro sanguíneo adecuado como consecuencia de infartos miocárdicos y cerebrales, isquemia mesentérica o de extremidad, o el resultado de una oclusión o estenosis vascular. En un ejemplo, la interrupción del suministro de sangre oxigenada puede deberse a una oclusión vascular. Dicha oclusión vascular puede ser causada por arteriosclerosis, traumatismo, procedimientos quirúrgicos, enfermedad y/u otras etiologías. Están disponibles técnicas rutinarias convencionales para determinar si un tejido está en riesgo de sufrir daño isquémico por oclusión vascular no deseada. Por ejemplo, en la enfermedad miocárdica, estos métodos incluyen una variedad de técnicas de formación de imágenes (p. ej., metodologías de radiotrazadores, radiografías y MRI) y pruebas fisiológicas. Por lo tanto, la inducción de la angiogénesis es un medio eficaz para prevenir o atenuar la isquemia en tejidos afectados o en riesgo de ser afectados por una oclusión vascular. Además, se contempla completamente el tratamiento del músculo esquelético y la isquemia miocárdica, apoplejía, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica, enfermedad de las arterias coronarias.

20 Un experto en la técnica de uso de técnicas convencionales puede medir la vascularización tisular. Los ejemplos no limitantes de medición de la vascularización en un sujeto incluyen SPECT (tomografía computarizada de emisión de un solo fotón); PET (tomografía de emisión de positrones); MRI (formación de imágenes por resonancia magnética); y combinación de las mismas, midiendo el flujo de sangre al tejido antes y después del tratamiento. La angiografía puede usarse como una evaluación de la vascularidad macroscópica. La evaluación histológica puede usarse para cuantificar la vascularización a nivel de los vasos pequeños. Estas y otras técnicas se describen en Simons, *et al.*, "Clinical trials in coronary angiogenesis" *Circulation*, 102, 73-86 (2000).

35 Métodos de reparación tisular

Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en un método de reparación tisular. Como se emplea en la presente memoria, "reparación tisular" significa potenciar la reparación, la regeneración, el crecimiento y/o el mantenimiento del tejido, incluyendo, pero no limitado a, la reparación de heridas o la obtención por ingeniería genética de tejidos. Un experto en la técnica aprecia que se requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos para la reparación tisular. A su vez, el tejido puede ser dañado por, incluyendo, pero no limitado a, lesiones o afecciones traumáticas incluyendo artritis, osteoporosis y otros trastornos del esqueleto, y quemaduras. El tejido también puede ser dañado por lesiones debidas a procedimientos quirúrgicos, irradiación, laceración, productos químicos tóxicos, infección vírica o infecciones bacterianas, o quemaduras. El tejido que necesita reparación también incluye heridas no cicatrizantes. Los ejemplos de heridas no cicatrizantes incluyen úlceras cutáneas no cicatrizantes producidas como consecuencia de patología diabética; o fracturas que no se curan fácilmente.

Los anticuerpos también se pueden usar en la reparación tisular en el contexto de los procedimientos de regeneración guiada de tejidos (GTR). Dichos procedimientos son usados actualmente por los expertos en la técnica para acelerar la cicatrización de heridas después de procedimientos quirúrgicos invasivos.

50 Los anticuerpos pueden usarse en un método de potenciación de la reparación tisular caracterizado por un mejor crecimiento de tejido durante el proceso de obtención de tejidos por ingeniería genética. Como se emplea en la presente memoria, "obtención de tejidos por ingeniería genética" se define como la creación, el diseño y la fabricación de dispositivos protésicos biológicos, en combinación con materiales sintéticos o naturales, para el aumento o el reemplazo de tejidos y órganos corporales. Por lo tanto, los presentes métodos pueden usarse para aumentar el diseño y el crecimiento de tejidos humanos fuera del cuerpo para su posterior implantación en la reparación o el reemplazo de tejidos enfermos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser útiles para potenciar el crecimiento de reemplazos de injertos de piel que se usan como terapia en el tratamiento de quemaduras.

En otro ejemplo de obtención de tejidos por ingeniería genética, los anticuerpos de la presente invención pueden incluirse en dispositivos que contienen células o que están exentos de células que inducen la regeneración de tejidos humanos funcionales cuando se implantan en un sitio que requiere regeneración. Como se describió anteriormente,

se puede usar la regeneración de tejido guiada por biomateriales para potenciar el recrecimiento óseo en, por ejemplo, la enfermedad periodontal. Así pues, se pueden usar anticuerpos para potenciar el crecimiento de tejidos reconstituidos ensamblados en configuraciones tridimensionales en el sitio de una herida u otro tejido que necesite dicha reparación.

- 5 En otro ejemplo de obtención de tejidos por ingeniería genética, los anticuerpos pueden incluirse en dispositivos externos o internos que contienen tejidos humanos diseñados para reemplazar la función de tejidos internos enfermos. Este enfoque implica aislar las células del cuerpo, colocarlas con matrices estructurales e implantar el nuevo sistema dentro del cuerpo o usar el sistema fuera del cuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden incluir en un injerto vascular revestido con células para potenciar el crecimiento de las células contenidas en el injerto. Se
10 prevé que los métodos de la invención se pueden usar para aumentar la reparación, la regeneración y la obtención por ingeniería genética de tejidos en productos tales como cartílago y hueso, tejidos del sistema nervioso central, músculo, hígado y células de islotes pancreáticos (productoras de insulina).

Formulaciones farmacéuticas y métodos de uso

- 15 Los anticuerpos de la invención se pueden administrar a individuos para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que estén regulados por genes y proteínas de la invención. El término "tratamiento" se emplea en la presente memoria para referirse a que la administración de un compuesto de la presente invención mitiga una enfermedad o un trastorno en un hospedador. Por lo tanto, el término "tratamiento" incluye, prevenir que se produzca un trastorno en un hospedador, en particular, cuando el hospedador está predispuesto a adquirir la enfermedad, pero aún no ha sido diagnosticado de la enfermedad; inhibir el trastorno; y/o aliviar o revertir el trastorno. En la medida en que los
20 métodos de la presente invención están dirigidos a prevenir trastornos, se entiende que el término "prevenir" no requiere que se impida por completo el estado patológico. (Véase el Noveno Diccionario Colegiado de Webster). En cambio, como se emplea en la presente memoria, el término prevención se refiere a la capacidad del experto en la técnica para identificar una población que sea susceptible a trastornos, de manera que la administración de los compuestos de la presente invención pueda ocurrir antes de que comience una enfermedad. El término no implica
25 que el estado patológico se evite por completo. Los compuestos identificados mediante los métodos de selección de la presente invención se pueden administrar conjuntamente con otros compuestos.

- La seguridad y la eficacia terapéutica de los compuestos identificados pueden determinarse mediante procedimientos convencionales usando tecnologías *in vitro* o *in vivo*. Se pueden preferir los compuestos que presentan grandes índices terapéuticos, aunque los compuestos con índices terapéuticos inferiores pueden ser útiles si el nivel de efectos secundarios es aceptable. Los datos obtenidos de las técnicas toxicológicas y farmacológicas *in vitro* e *in vivo* pueden usarse para formular el intervalo de dosis.
30

La eficacia de un compuesto puede evaluarse además en modelos animales o en ensayos clínicos de pacientes con angiogénesis no regulada o regulada indebidamente.

- 35 Como se emplea en la presente memoria, se entiende que "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, dichos medios se pueden usar en las composiciones de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios a las
40 composiciones. Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración deseada. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, p. ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. El preparado parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o
50 viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsippany, N. J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del
60

tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo a la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida a un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y el resto de ingredientes requeridos. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente esterilizada del mismo.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que se ha de atravesar. Dichos agentes penetrantes son conocidos en general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede realizarse usando pulverizados nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas, como se conoce en general en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto frente a la eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse en el mercado en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. "Forma de unidad de dosificación" como se emplea en la presente memoria se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que se vaya a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico que debe alcanzarse en particular, y de las limitaciones inherentes en la técnica de combinar dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Producción de la proteína del dominio extracelular de HPTPβ

Métodos: se clona la HPTPβ de longitud completa desde una biblioteca de placenta humana según las instrucciones del fabricante (Origene). El clon es idéntico a un clon de ADNc previamente publicado (n.º de acceso del Genbank X54131) a excepción de que carece de la repetición FNIII n.º 5. Se clona un ADNc que codifica todo el dominio extracelular soluble (ECD) de HPTPβ mediante PCR a partir del ADNc de longitud completa (véase la secuencia que figura más adelante) que codifica los aminoácidos 1-1534 con una His-His-His-His-His-His-Gly (6His-Gly) C-terminal (SEQ ID NO: 1). Se clona el ADNc resultante en vectores de expresión de mamífero para la expresión transitoria (pShuttle-CMV) o estable (pcDNA3.1 (-)) en células HEK293. Para obtener el ECD de HPTPβ (βECD) purificado, las células HEK293 transfectadas con un vector de expresión de βECD se incuban en OptiMEM sin suero (Gibco) durante 24 horas en condiciones normales de crecimiento. Se recupera el medio acondicionado, se centrifuga para eliminar los residuos (1000 rpm x 5 minutos) y se añade 1 ml de Ni-NTA agarosa lavada (Qiagen) (500 µl de material envasado) a cada 10 ml de medio aclarado y se deja reposar durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se carga la mezcla en una columna y se lava con 20 volúmenes de lecho de NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8. A continuación, se eluye la proteína de dominio extracelular de HPTPβ purificada (SEQ ID NO: 2) en seis fracciones con 200 µl/elución en NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8. Se analizan las fracciones para determinar el contenido de proteínas usando electroforesis en gel de poliacrilimida SDS reductora-desnaturalizante y se detectan mediante tinción con plata (Invitrogen) y se confirman por espectrometría de masas.

Resultados: para desarrollar un anticuerpo contra el dominio extracelular de HPTPβ, se desarrollan vectores de

expresión que dirigen la expresión de una proteína de dominio extracelular de HPTP β marcada con 6-His (Figura 1, Panel A). Posteriormente, se purifica la proteína de dominio extracelular de HPTP β marcada con 6-His hasta casi la homogeneidad (Figura 1, Panel B) del medio acondicionado de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión.

5 Ejemplo 2. Generación de anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de HPTP β

Métodos: para la producción del inmunógeno del dominio extracelular de HPTP β , se conjuga la proteína de dominio extracelular de HPTP β -6His purificada con tiroglobulina porcina (Sigma) usando química de acoplamiento de EDC (Hockfield, S. *et al*, (1993) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volumen 1 pág. 111-201, *Immunocytochemistry*). El conjugado de dominio extracelular de HPTP β -tiroglobulina resultante se somete a diálisis contra PBS, pH 7,4. A
 10 continuación, se inmunizan ratones Balb/c adultos por vía subcutánea con el conjugado (100-200 μ g) y adyuvante de Freund completo en una mezcla 1:1. Después de 2-3 semanas, se inyecta a los ratones por vía intraperitoneal o subcutánea adyuvante de Freund incompleto y el conjugado en una mezcla 1:1. La inyección se repite a las 4-6 semanas. Se recogen los sueros de ratones 7 días después de la tercera inyección y se ensayan para determinar la inmunorreactividad hacia el antígeno del dominio extracelular de HPTP β mediante ELISA y transferencia Western.
 15 Los ratones que muestran una buena respuesta al antígeno se refuerzan mediante una sola inyección intra-bazo con 50 μ l de proteína de dominio extracelular de HPTP β purificada mezclada 1:1 con hidróxido de Alum usando una aguja extra larga de calibre 31 (Goding, J. W., (1996) "Monoclonal Antibodies: Principles and Practices". Tercera edición, Academic Press Limited, pág. 145). En resumen, los ratones se anestesian con avertina al 2,5 %, y se crea una incisión de 1 centímetro en la piel y la pared oblicua izquierda del cuerpo. Se administra la mezcla de antígenos insertando la aguja desde la parte posterior a la parte anterior del bazo en una inyección longitudinal. Se sutura la pared del cuerpo y la piel se sella con dos pequeños clips metálicos. Los ratones son controlados para una recuperación segura. Cuatro días después de la cirugía se extrae el bazo del ratón y se preparan suspensiones monocelulares para la fusión con células de mieloma de ratón para la creación de líneas celulares de hibridoma (Spitz, M., (1986) "Methods In Enzymology", volumen 121. Eds. John J, Lagone and Helen Van Vunakis. pág.33-41 (Academic Press, Nueva York, NY)). Los hibridomas resultantes se cultivan en medio modificado por Dulbeccos (Gibco) suplementado con suero de ternero fetal al 15 % (Hyclone) e hipoxatina, aminopterina y timidina.

La detección de los hibridomas positivos comienza 8 días después de la fusión y continúa durante 15 días. Los hibridomas que producen anticuerpos anti-dominio extracelular de HPTP β se identifican mediante ELISA en dos conjuntos de placas de 96 pocillos: uno recubierto con el dominio extracelular de HPTP β marcado con histidina y el otro recubierto con una proteína MurA bacteriana marcada con histidina como control negativo. El anticuerpo secundario es una IgG de asno anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Immunoresearch). La inmunorreactividad se controla en pocillos usando el desarrollo de color iniciado por comprimidos de ABTS disueltos en tampón TBS, pH 7,5. Las mezclas de reacción de HRP individuales se terminan mediante la adición de 100 microlitros de SDS al 1 % y la lectura de la absorbancia a 405 nm con un espectrofotómetro. Los hibridomas que producen anticuerpos que interactúan con el dominio extracelular de HPTP
 30 β -6His, y no con la proteína murA-6His se usan para un análisis posterior. Se realizan dos veces diluciones limitadoras (0,8 células por pocillo) en clones positivos en placas de 96 pocillos, definiéndose la clonalidad como la que tiene más del 99 % de los pocillos con reactividad positiva. Los isotipos de anticuerpos se determinan usando la tecnología iso-strip (Roche). Para obtener el anticuerpo purificado para una evaluación adicional, se purifican los sobrenadantes del cultivo tisular por afinidad usando columnas de proteína A o proteína G.
 40

Resultados: se aíslan cinco anticuerpos monoclonales inmunorreactivos hacia la proteína de dominio extracelular de HPTP β y se les da la siguiente nomenclatura R15E6, R12A7, R3A2, R11C3, R15G2 y R5A8.

El anticuerpo monoclonal R15E6 es depositado en la colección americana de cultivos tipo (ATCC), código postal 1549, Manassas, VA 20108 EE.UU., 4 de mayo de 2006.

45 Ejemplo 3. R15E6 se une a HPTP β endógena en células endoteliales humanas

A. R15E6 se une a la HPTP β endógena como se demuestra mediante inmunoprecipitación y transferencia Western

Materiales: células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), medio EGM y solución neutralizante de tripsina de Cambrex; OPTIMEM I (Gibco), albúmina de suero bovino (BSA, Santa Cruz), solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco), factores de crecimiento incluyendo Angiopoyetina 1 (Ang1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (R&D Systems), anticuerpo monoclonal Tie2 (Duke University/P&GP), anticuerpo policlonal contra el receptor VEGF 2 (VEGFR2) (Whitaker *et al*), proteína A/G agarosa (Santa Cruz), sistema de electroforesis/transferencia de gel pre-moldeado de Tris-Glicina (6-8 %) (Invitrogen), membranas de PVDF (Invitrogen), tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, glicerol al 10 %, triton-X-100 al 1 %, EDTA 2 mM, NaOV 1 mM, NaF 1 mM, PMSF 1 mM, 1 μ g/ml de leupeptina, 1 μ g/ml de pepstatina).
 50
 55

Método: se tratan previamente las HUVEC durante 30 min con anticuerpo (en OPTIMEM) u OPTIMEM I solo. Tras retirar el pretratamiento, se tratan las células con Ang1 (100 ng/ml) durante 6 minutos en PBS + BSA al 0,2 % y se lisan en tampón de lisis. Los lisados se aplican directamente sobre un gel de Tris-Glicina o se inmunoprecipitan con 2-5 μ g/ml de anticuerpo Tie-2 o 10 μ g/ml de anticuerpo R15E6 y proteína agarosa A/G. Se enjuagan las muestras

inmunoprecipitadas 1 vez con tampón de lisis y se hierven durante 5 min en 1 x tampón de muestra. Se resuelven las muestras en un gel de Tris-Glicina, se transfieren a una membrana de PVDF y se detectan mediante transferencia Western usando los anticuerpos indicados (Ab pTYR (PY99, Santa Cruz), Tie-2, VEGFR2 y/o R15E6).

5 Resultados: mediante IP/transferencia Western, R15E6 reconoce una banda principal, de alto peso molecular coincidente con el tamaño de HPTPβ (Figura 2; Panel A, Carril 2). Las bandas menos intensas, de menor peso molecular, probablemente representan formas precursoras menos glicosiladas de HPTPβ. Una inmunoprecipitación (IP) con IgG no inmune, de control, no muestra bandas en el intervalo de pesos moleculares de HPTPβ (Figura 2, Panel A, Carril 1) y una IP de Tie2/VEGFR2 combinados muestra bandas del peso molecular esperado (Figura 2, Panel A, Carril 3). Este resultado demuestra que R15E6 reconoce y es específico de HPTPβ.

10 B. R15E6 se une a la HPTPβ endógena como se demuestra mediante análisis de FACS

Materiales: HUVEC, medio EGM y solución neutralizante de tripsina de Cambrex; Anticuerpo secundario marcado con Alexfluor 488 de Molecular Probes; Solución salina equilibrada de Hanks (Gibco); citómetro de flujo FACSCAN y software CellQuest de Becton Dickenson.

15 Método: se someten las HUVEC a tripsinización, se tratan con solución neutralizante de tripsina y se enjuagan con HBSS. Se añade anticuerpo R15E6 (0,6 µg) a 250.000 células en 50 µl de HBSS y se incuba en hielo durante 20 minutos. Las células se enjuagan con 1 ml de HBSS seguido de la adición de 2 µg de anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia durante 20 minutos en hielo. Se enjuagan las células y se vuelven a suspender en 1 ml de HBSS, y luego se analizan en el citómetro de flujo FACSCAN con el software CellQuest. Las células de control se tratan únicamente con anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia.

20 Resultados: mediante análisis de FACS, HUVEC intactas, R15E6 causa un potente desplazamiento (> 90 % de las células) en la señal de fluorescencia en comparación con el anticuerpo secundario solo (Figura 2, Panel B). Este resultado indica que R15E6 se une a HPTPβ endógena presentada en la superficie de las células endoteliales intactas.

25 Ejemplo 4. R15E6 mejora la activación de Tie2 y potencia múltiples respuestas angiogénicas (supervivencia de células endoteliales, migración y morfogénesis capilar)

A. R15E6 mejora la fosforilación de Tie2 en ausencia y en presencia de la angiopoyetina 1 (Ang1), el ligando Tie2

30 Métodos: se cultivan HUVEC en medio libre de suero como se describió anteriormente en presencia o en ausencia de diversas concentraciones de R15E6 y con o sin Ang1 añadida. Se preparan lisados, se inmunoprecipitan con un anticuerpo Tie2, se resuelven mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfieren a una membrana de PVDF. A continuación, se someten proteínas inmunoprecipitadas unidas a membrana a transferencia Western en serie con un anticuerpo antifosfotirosina para cuantificar la fosforilación de Tie2 seguida por un anticuerpo Tie2 para cuantificar el total de Tie2. La fosforilación de Tie2 se expresa como la proporción de la señal de antifosfotirosina con respecto a la señal total de Tie2.

35 Resultados: R15E6 mejora la fosforilación de Tie2 tanto en ausencia como en presencia de Ang1 (Figura 3). Este resultado indica que la unión de R15E6 a HPTPβ en la superficie de las células endoteliales modula su función biológica produciendo una mejor activación de Tie2 en ausencia o en presencia de ligando.

B. R15E6 mejora la supervivencia de células endoteliales en ausencia y en presencia de factores de crecimiento endotelial

40 Materiales: HUVEC, medios EGM y solución neutralizante de tripsina de Cambrex; DMEM (Cell Gro), BSA deslipidada (BD Falcon), Ensayo de ATP Cell Titer Glo (Promega), factores de crecimiento (Ang1, VEGF 165 y FGF) (R&D Systems), lector de placas Victor V Multilabel (Perkin Elmer Wallac).

45 Método: Se sembraron HUVEC en placas a 10.000 células/pocillo, se privaron de suero en DMEM/BSA al 0,2 % y se trataron durante 72 h en presencia o ausencia de factor de crecimiento (Ang1, VEGF o FGF) con o sin diversas concentraciones de anticuerpo R15E6. Tras 72 horas, se enjuagan las células con DMEM, y se cuantifican las células supervivientes midiendo los niveles de ATP usando el ensayo de luminiscencia Cell Titer Glo según las instrucciones del fabricante (Promega).

50 Resultados: de acuerdo con los resultados del ensayo de activación de Tie2, R15E6 aumenta la supervivencia de las células endoteliales en ausencia de factor de crecimiento añadido a concentraciones de entre 0,5 y 5 nM (Figura 4, Panel A). De forma similar, R15E6 aumenta la supervivencia de las células endoteliales mediada por Ang1 (Figura 4, Panel A), así como la supervivencia celular mediada por VEGF y FGF (Figura 4, Paneles B y C). No se observa supervivencia mejorada con un anticuerpo monoclonal de control (Figura 4, Panel D). Estos resultados demuestran que la unión de R15E6 a HPTPβ en la superficie de las células endoteliales mejora la supervivencia de las células endoteliales basales, así como la supervivencia celular mediada por múltiples vías angiogénicas (Ang1, VEGF y FGF).

55 C. R15E6 mejora la migración de las células endoteliales en ausencia y en presencia de VEGF

Materiales: HUVEC, medios EGM y solución neutralizante de tripsina de Cambrex; EBM libre de rojo fenol (PRF-EBM, Cambrex), BSA deslipidada (BD Falcon), Sistema de migración de células endoteliales BD Falcon Biocoat (BD Falcon), Calceína AM (Molecular Probes); factores de crecimiento (VEGF 165) (R&D Systems), lector de placas Victor V Multilabel (Perkin Elmer Wallac).

5 Método: Se volvieron a suspender HUVEC en PRF-EBM + BSA al 0,1 % y se sembraron a 50.000 células/transpocillo (BD Bioscience, tamaño de poro de 3 μ m). El factor de crecimiento/R15E6 se coloca en el pocillo inferior de la cámara de transpocillos y se incuba durante 4-22 h. Las células que migran a través de la membrana se detectan marcando con 4 μ g/ml de Calceína AM durante 90 min. La fluorescencia se mide usando un instrumento Victor V (485/535).

10 Resultados: en consonancia con los resultados del estudio de supervivencia, R15E6 mejora la migración de las células endoteliales tanto basal como mediada por VEGF (Figura 5).

D. R15E6 mejora el crecimiento de células endoteliales y la morfogénesis capilar en ausencia y en presencia de factores de crecimiento endotelial

15 Materiales: HUVEC y medios EGM de Cambrex; perlas Cytodex y colágeno de tipo I de Sigma; medios PBS y M199 de Dulbecco de Gibco; VEGF de R&D.

Método: Se cultivan HUVEC de paso 4 (células 2×10^6) con 5 mg de perlas Cytodex en 10 ml de EGM en placas bacteriológicas tratadas con cultivo no tisular de 100 mm durante 48 horas con vórtice ocasional. Las perlas recubiertas con células se transfieren a un tubo cónico de 50 ml y se vuelven a suspender en 380 μ l de D-PBS. Los geles de colágeno se preparan mediante la adición de 71,4 μ l de perlas recubiertas con células a 2,8 ml de una solución matricial que consiste en 3 mg/ml de colágeno en medio M199 suplementado con NaOH 0,005 N, HEPES 20 mM y NaHCO₃ 26 mM. Se dispensan trescientos cincuenta microlitros de las perlas en un pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos y se deja solidificar la matriz durante 1 hora a 37 °C/CO₂ al 5 %. Se añade 1 ml de medio EGM con o sin VEGF (10 ng/ml) o R15E6 (7,5 μ g/ml) por pocillo y se devuelve a la incubadora. Después de 48 horas, un observador con ocultación visualiza los crecimientos con un microscopio invertido de contraste de fase, y observa 50 perlas por pocillo, en pocillos por triplicado, para la presencia de crecimientos de células endoteliales. Los resultados se expresan como el número de crecimientos por perla.

Resultados: en consonancia con los resultados de los otros ensayos, R15E6 también mejora la morfogénesis capilar basal y mediada por VEGF en el ensayo de crecimiento de perlas endoteliales (Figura 6).

30 Ejemplo 5. El epítipo de unión para R15E6 está en la repetición FN3 N-terminal del dominio extracelular de HPTP β humana

A. El análisis de transferencia Western de mutantes de truncamiento C-terminal recombinantes y las proteínas quiméricas de ratón/ser humano muestran que el epítipo de unión a R15E6 está en la repetición FN3 N-terminal del dominio extracelular de HPTP β

Métodos: se transfectan las células HEK293 con vectores de expresión que codifican el mutante de truncamiento de HPTP β o la quimera de ratón/ser humano indicados. A continuación, se incuban las células transfectadas en OptiMEM durante 24 horas más, tras lo que se recoge el medio acondicionado que contiene el dominio extracelular de HPTP β y bien se almacena para su uso futuro o se usa inmediatamente para estudios de transferencia Western o ECL (véase más adelante). Para el análisis de transferencia Western, se resuelven 20 μ l de medio acondicionado que contiene la proteína HPTP β indicada o ninguna proteína recombinante (simulado, vector vacío transfectado) mediante PAGE, se transfiere a una membrana de PVDF y se sonda con R15E6.

Resultados: mediante análisis de transferencia Western, R15E6 se une a todos los mutantes de eliminación C-terminal de HPTP β (Figura 7A), indicando que el epítipo de unión está dentro de las dos primeras repeticiones FN3 N-terminales. R15E6 no se une al dominio extracelular de HPTP β murina (SEQ ID NO: 7), lo que demuestra especificidad para la proteína humana (Figura 7B, carril 6 frente a carril 2). El reemplazo de la primera o de la primera y la segunda repetición FN3 N-terminal murina por las secuencias humanas restableció la unión de R15E6 (Figura 7B, carriles 3 y 5). Por el contrario, el reemplazo de solo la segunda repetición FN3 murina con la secuencia humana no restablece la unión (Figura 7B, carril 4). En conjunto, estos hallazgos localizan el epítipo de unión de R15E6 en la repetición FN3 N-terminal (~100 aminoácidos) de HPTP β humana.

50 B. El análisis ECF (electroquimioluminiscente) de mutantes de truncamiento terminal y las proteínas quiméricas de ratón/ser humano confirman que el epítipo de unión a R15E6 está en la repetición FN3 N-terminal del dominio extracelular de HPTP β

Métodos: Los sobrenadantes que contienen la proteína HPTP β indicada se recubren en una placa de MSD de 96 pocillos de alta unión (Meso Scale Discovery), se dejan secar y se bloquean con BSA al 3 % durante 1 h. La proteína se incuba luego con el anticuerpo monoclonal R15E6 o el fragmento Fab de R15E6 (10 nM o 1,5 μ g/ml) durante 1 h, se enjuaga y se incuba con un anticuerpo anti-ratón de cabra con un marcador MSD-Tag (10 nM) durante 1 h. Se enjuaga el anticuerpo en exceso y se añade tampón de lectura de MSD. Se mide la emisión de luz usando el lector Sector 2400 (MSD). El MSD utiliza la detección electroquimioluminiscente para detectar las uniones en matrices con

patrón. La tecnología de Meso Scale Discovery usa microplacas MULTI-ARRAY™ y MULTI-SPOT™ patentadas con electrodos integrados en la parte inferior de la placa. Los electrodos de MSD están hechos de carbono, y los reactivos biológicos pueden unirse al carbono simplemente por adsorción pasiva y conservar un alto nivel de actividad biológica. Los ensayos de MSD usan marcadores electroquimioluminiscentes para la detección ultrasensible. Estos marcadores electroquimioluminiscentes emiten luz cuando se estimulan electroquímicamente. El proceso de detección se inicia en los electrodos incorporados situados en la parte inferior de las microplacas de MSD y solo se excitan los marcadores que están cerca del electrodo, y la luz se detecta a 620 nm.

Resultados: en consonancia con los estudios de transferencia Western, R15E6 se une a todas las proteínas de truncamiento C-terminal HPTPβ mediante el análisis de MSD (Figura 8A). También coincidiendo con el análisis de transferencia Western, R15E6 no se une al dominio extracelular de HPTPβ murina, pero la unión se restablece mediante la sustitución de la repetición FN3 N-terminal murina con el dominio FN3 N-terminal humano (Figura 8B). Estos datos confirman que el epítipo de unión de R15E6 está en la repetición FN3 N-terminal de HPTPβ humana. Como era de esperar, el epítipo de unión del fragmento Fab de R15E6 monovalente también se podría correlacionar con la repetición FN3 más N-terminal de HPTPβ humana (Figura 9).

Ejemplo 6. Un fragmento Fab de R15E6 monovalente bloquea la activación de Tie2 mediada por R15E6 e inhibe la supervivencia y la migración de las células endoteliales

Métodos: la activación de Tie2, y los ensayos de supervivencia y migración de células endoteliales se realizan como se describió anteriormente en el Ejemplo 4. Los fragmentos Fab de R15E6 monovalentes se preparan como se describió anteriormente. Se somete el R15E6 purificado a diálisis en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, que contiene EDTA 2 mM y ditiotretitol 1 mM. Se activa la papaína (Pierce) a 1-2 mg/ml en el tampón anteriormente mencionado durante 15 minutos a 37 °C. Se incuba R15E6 a 10 mg/ml con papaína en el mismo tampón usando una proporción de enzima:sustrato de 1:100, durante 1 h a 37 °C. La digestión se termina mediante la adición de yodoacetamida (concentración final de 20 mM), y se mantiene sobre hielo durante 1 h, protegido de la luz. Se somete el material digerido con papaína a diálisis toda la noche contra solución salina tamponada con fosfato, para eliminar la yodoacetamida. Se controla la extensión de la digestión mediante SDS-PAGE con la desaparición de la cadena pesada gamma (PM 55.000 kDa) y la aparición del fragmento Fc de las cadenas gamma (PM 27.000 kDa) y ligera (PM 22.000-25.000 kDa).

Resultados: a diferencia del anticuerpo R15E6 intacto, los fragmentos Fab no mejoran la activación de Tie2 (Figura 10). Además, en presencia de fragmento Fab en exceso, la activación de Tie2 mediada por R15E6 se bloquea (Figura 10). Sorprendentemente, el fragmento Fab de R15E6 inhibe marcadamente la supervivencia de las células endoteliales en comparación con un Fab de control (Figura 11A), y este efecto podría rescatarse mediante la adición de R15E6 intacto (Figura 11B). Coincidiendo con el efecto negativo sobre la supervivencia endotelial, el Fab de R15E6 también bloquea la migración de las células endoteliales mediada por VEGF (Figura 12). Estos hallazgos demuestran que el R15E6 dimérico, intacto, es necesario para mejorar la señalización angiogénica y que el R15E6 monomérico bloquea estas acciones y, en realidad, tiene un efecto negativo sobre las respuestas de las células endoteliales angiogénicas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Aerpio Therapeutics, Inc.

5 <120> ANTICUERPOS QUE SE UNEN A LA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA Beta HUMANA (HPTP-Beta) Y USOS DE LOS MISMOS

<130> P103352EP52

10 <140> 11 155518.1
<141> 2007-04-05

<150> US 60/790,506
<151> 07-04-2006

15 <150> US 60/798,896
<151> 09-05-2006

<160> 11

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 4623

25 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS

30 <222> (1)..(4623)

<400> 1

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

ES 2 643 469 T3

115	120	125	
cat gtt tgg tgg act cct tct tcc gga aaa gtc acc tca tat gag gtg			432
His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val			
130	135	140	
caa tta ttt gat gaa aat aac caa aag ata cag ggg gtt caa att caa			480
Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln			
145	150	155	160
gaa agt act tca tgg aat gaa tac act ttt ttc aat ctc act gct ggt			528
Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly			
165	170	175	
agt aaa tac aat att gcc atc aca gct gtt tct gga gga aaa cgt tct			576
Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser			
180	185	190	
ttt tca gtt tat acc aat gga tca aca gtg cca tct cca gtg aaa gat			624
Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp			
195	200	205	
att ggt att tcc aca aaa gcc aat tct ctc ctg att tcc tgg tcc cat			672
Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His			
210	215	220	
ggt tct ggg aat gtg gaa cga tac cgg ctg atg cta atg gat aaa ggg			720
Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly			
225	230	235	240
atc cta gtt cat ggc ggt gtt gtg gac aaa cat gct act tcc tat gct			768
Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala			
245	250	255	
ttt cac ggg ctg acc cct ggc tac ctc tac aac ctc act gtt atg act			816
Phe His Gly Leu Thr Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr			
260	265	270	
gag gct gca ggg ctg caa aac tac agg tgg aaa cta gtc agg aca gcc			864
Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala			
275	280	285	
ccc atg gaa gtc tca aat ctg aag gtg aca aat gat ggc agt ttg acc			912
Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr			
290	295	300	
tct cta aaa gtc aaa tgg caa aga cct cct gga aat gtg gat tct tac			960
Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr			
305	310	315	320
aat atc acc ctg tct cac aaa ggg acc atc aag gaa tcc aga gta tta			1008
Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu			
325	330	335	
gca cct tgg att act gaa act cac ttt aaa gag tta gtc ccc ggt cga			1056
Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg			
340	345	350	
ctt tat caa gtt act gtc agc tgt gtc tct ggt gaa ctg tct gct cag			1104
Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln			
355	360	365	
aag atg gca gtg ggc aga aca ttc ccc ctg gct gtc ctc cag ctt cgt			1152

ES 2 643 469 T3

Lys	Met	Ala	Val	Gly	Arg	Thr	Phe	Pro	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Leu	Arg		
370						375					380						
gtc	aaa	cat	gcc	aat	gaa	acc	tca	ctg	agt	atc	atg	tgg	cag	acc	cct	1200	
Val	Lys	His	Ala	Asn	Glu	Thr	Ser	Leu	Ser	Ile	Met	Trp	Gln	Thr	Pro		
385				390					395					400			
gta	gca	gaa	tgg	gag	aaa	tac	atc	att	tcc	cta	gct	gac	aga	gac	ctc	1248	
Val	Ala	Glu	Trp	Glu	Lys	Tyr	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Asp	Arg	Asp	Leu		
			405					410						415			
tta	ctg	atc	cac	aag	tca	ctc	tcc	aaa	gat	gcc	aaa	gaa	ttc	act	ttt	1296	
Leu	Leu	Ile	His	Lys	Ser	Leu	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Phe	Thr	Phe		
			420					425					430				
act	gac	ctg	gtg	cct	gga	cga	aaa	tac	atg	gct	aca	gtc	acc	agt	att	1344	
Thr	Asp	Leu	Val	Pro	Gly	Arg	Lys	Tyr	Met	Ala	Thr	Val	Thr	Ser	Ile		
		435					440					445					
agt	gga	gac	tta	aaa	aat	tcc	tct	tca	gta	aaa	gga	aga	aca	gtg	cct	1392	
Ser	Gly	Asp	Leu	Lys	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Thr	Val	Pro		
	450				455						460						
gcc	caa	gtg	act	gac	ttg	cat	gtg	gcc	aac	caa	gga	atg	acc	agt	agt	1440	
Ala	Gln	Val	Thr	Asp	Leu	His	Val	Ala	Asn	Gln	Gly	Met	Thr	Ser	Ser		
465				470					475					480			
ctg	ttt	act	aac	tgg	acc	cag	gca	caa	gga	gac	gta	gaa	ttt	tac	caa	1488	
Leu	Phe	Thr	Asn	Trp	Thr	Gln	Ala	Gln	Gly	Asp	Val	Glu	Phe	Tyr	Gln		
			485					490						495			
gtc	tta	ctg	atc	cat	gaa	aat	gtg	gtc	att	aaa	aat	gaa	agc	atc	tcc	1536	
Val	Leu	Leu	Ile	His	Glu	Asn	Val	Val	Ile	Lys	Asn	Glu	Ser	Ile	Ser		
			500				505						510				
agt	gag	acc	agc	aga	tac	agc	ttc	cac	tct	ctc	aag	tcc	ggc	agc	ctg	1584	
Ser	Glu	Thr	Ser	Arg	Tyr	Ser	Phe	His	Ser	Leu	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu		
		515				520						525					
tac	tcc	gtg	gtg	gta	aca	aca	gtg	agt	gga	ggg	atc	tct	tcc	cga	caa	1632	
Tyr	Ser	Val	Val	Val	Thr	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ser	Ser	Arg	Gln		
	530				535						540						
gtg	gtt	gtg	gag	gga	aga	aca	gtc	cct	tcc	agt	gtg	agt	gga	gta	acg	1680	
Val	Val	Val	Glu	Gly	Arg	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Val	Thr		
545				550					555					560			
gtg	aac	aat	tcc	ggt	cgt	aat	gac	tac	ctc	agc	gtt	tcc	tgg	ctg	ctg	1728	
Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Asn	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Ser	Trp	Leu	Leu		
			565					570						575			
gcg	ccc	gga	gat	gtg	gat	aac	tat	gag	gta	aca	ttg	tct	cat	gac	ggc	1776	
Ala	Pro	Gly	Asp	Val	Asp	Asn	Tyr	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	His	Asp	Gly		
			580					585					590				
aag	gtg	gtt	cag	tcc	ctt	gtc	att	gcc	aag	tct	gtc	aga	gaa	tgt	tcc	1824	
Lys	Val	Val	Gln	Ser	Leu	Val	Ile	Ala	Lys	Ser	Val	Arg	Glu	Cys	Ser		
		595				600						605					
ttc	agc	tcc	ctc	acc	cca	ggc	cgc	ctc	tac	acc	gtg	acc	ata	act	aca	1872	
Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly	Arg	Leu	Tyr	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Thr		
	610					615					620						

ES 2 643 469 T3

agg agt ggc aag tat gaa aat cac tcc ttc agc caa gag cgg aca gtg Arg Ser Gly Lys Tyr Glu Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val 625 630 635 640	1920
cct gac aaa gtc cag gga gtc agt gtt agc aac tca gcc agg agt gac Pro Asp Lys Val Gln Gly Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp 645 650 655	1968
tat tta agg gta tcc tgg gtg cat gcc act gga gac ttt gat cac tat Tyr Leu Arg Val Ser Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr 660 665 670	2016
gaa gtc acc att aaa aac aaa aac aac ttc att caa act aaa agc att Glu Val Thr Ile Lys Asn Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile 675 680 685	2064
ccc aag tca gaa aac gaa tgt gta ttt gtt cag cta gtc cct gga cgg Pro Lys Ser Glu Asn Glu Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg 690 695 700	2112
ttg tac agt gtc act gtt act aca aaa agt gga caa tat gaa gcc aat Leu Tyr Ser Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn 705 710 715 720	2160
gaa caa ggg aat ggg aga aca att cca gag cct gtt aag gat cta aca Glu Gln Gly Asn Gly Arg Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr 725 730 735	2208
ttg cgc aac agg agc act gag gac ttg cat gtg act tgg tca gga gct Leu Arg Asn Arg Ser Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala 740 745 750	2256
aat ggg gat gtc gac caa tat gag atc cag ctg ctc ttc aat gac atg Asn Gly Asp Val Asp Gln Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met 755 760 765	2304
aaa gta ttt cct cct ttt cac ctt gta aat acc gca acc gag tat cga Lys Val Phe Pro Pro Phe His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg 770 775 780	2352
ttt act tcc cta aca cca ggc cgc caa tac aaa att ctt gtc ttg acg Phe Thr Ser Leu Thr Pro Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr 785 790 795 800	2400
att agc ggg gat gta cag cag tca gcc ttc att gag ggc ttc aca gtt Ile Ser Gly Asp Val Gln Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val 805 810 815	2448
cct agt gct gtc aaa aat att cac att tct ccc aat gga gca aca gat Pro Ser Ala Val Lys Asn Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp 820 825 830	2496
agc ctg acg gtg aac tgg act cct ggt ggg gga gac gtt gat tcc tac Ser Leu Thr Val Asn Trp Thr Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr 835 840 845	2544
acg gtg tcg gca ttc agg cac agt caa aag gtt gac tct cag act att Thr Val Ser Ala Phe Arg His Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile 850 855 860	2592
ccc aag cac gtc ttt gag cac acg ttc cac aga ctg gag gcc ggg gag Pro Lys His Val Phe Glu His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Glu 865 870 875 880	2640

ES 2 643 469 T3

cag tac cag atc atg att gcc tca gtc agc ggg tcc ctg aag aat cag Gln Tyr Gln Ile Met Ile Ala Ser Val Ser Gly Ser Leu Lys Asn Gln 885 890 895	2688
ata aat gtg gtt ggg cgg aca gtt cca gca tct gtc caa gga gta att Ile Asn Val Val Gly Arg Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly Val Ile 900 905 910	2736
gca gac aat gca tac agc agt tat tcc tta ata gta agt tgg caa aaa Ala Asp Asn Ala Tyr Ser Ser Tyr Ser Leu Ile Val Ser Trp Gln Lys 915 920 925	2784
gct gct ggt gtg gca gaa aga tat gat atc ctg ctt cta act gaa aat Ala Ala Gly Val Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu Leu Thr Glu Asn 930 935 940	2832
gga atc ctt ctg cgc aac aca tca gag cca gcc acc act aag caa cac Gly Ile Leu Leu Arg Asn Thr Ser Glu Pro Ala Thr Thr Lys Gln His 945 950 955 960	2880
aaa ttt gaa gat cta aca cca gcc aag aaa tac aag ata cag atc cta Lys Phe Glu Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys Tyr Lys Ile Gln Ile Leu 965 970 975	2928
act gtc agt gga ggc ctc ttt agc aag gaa gcc cag act gaa ggc cga Thr Val Ser Gly Gly Leu Phe Ser Lys Glu Ala Gln Thr Glu Gly Arg 980 985 990	2976
aca gtc cca gca gct gtc acc gac ctg agg atc aca gag aac tcc acc Thr Val Pro Ala Ala Val Thr Asp Leu Arg Ile Thr Glu Asn Ser Thr 995 1000 1005	3024
agg cac ctg tcc ttc cgc tgg acc gcc tca gag ggg gag ctc agc Arg His Leu Ser Phe Arg Trp Thr Ala Ser Glu Gly Glu Leu Ser 1010 1015 1020	3069
tgg tac aac atc ttt ttg tac aac cca gat ggg aat ctc cag gag Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Asn Leu Gln Glu 1025 1030 1035	3114
aga gct caa gtt gac cca cta gtc cag agc ttc tct ttc cag aac Arg Ala Gln Val Asp Pro Leu Val Gln Ser Phe Ser Phe Gln Asn 1040 1045 1050	3159
ttg cta caa ggc aga atg tac aag atg gtg att gta act cac agt Leu Leu Gln Gly Arg Met Tyr Lys Met Val Ile Val Thr His Ser 1055 1060 1065	3204
ggg gag ctg tct aat gag tct ttc ata ttt ggt aga aca gtc cca Gly Glu Leu Ser Asn Glu Ser Phe Ile Phe Gly Arg Thr Val Pro 1070 1075 1080	3249
gcc tct gtg agt cat ctc agg ggg tcc aat cgg aac acg aca gac Ala Ser Val Ser His Leu Arg Gly Ser Asn Arg Asn Thr Thr Asp 1085 1090 1095	3294
agc ctt tgg ttc aac tgg agt cca gcc tct ggg gac ttt gac ttt Ser Leu Trp Phe Asn Trp Ser Pro Ala Ser Gly Asp Phe Asp Phe 1100 1105 1110	3339
tat gag ctg att ctc tat aat ccc aat ggc aca aag aag gaa aac Tyr Glu Leu Ile Leu Tyr Asn Pro Asn Gly Thr Lys Lys Glu Asn	3384

ES 2 643 469 T3

1115		1120		1125	
tgg aaa gac aag gac ctg acg gag tgg cgg ttt caa ggc ctt gtt					3429
Trp Lys Asp Lys Asp Leu Thr Glu Trp Arg Phe Gln Gly Leu Val					
1130		1135		1140	
cct gga agg aag tac gtg ctg tgg gtg gta act cac agt gga gat					3474
Pro Gly Arg Lys Tyr Val Leu Trp Val Val Thr His Ser Gly Asp					
1145		1150		1155	
ctc agc aat aaa gtc aca gcg gag agc aga aca gct cca agt cct					3519
Leu Ser Asn Lys Val Thr Ala Glu Ser Arg Thr Ala Pro Ser Pro					
1160		1165		1170	
ccc agt ctt atg tca ttt gct gac att gca aac aca tcc ttg gcc					3564
Pro Ser Leu Met Ser Phe Ala Asp Ile Ala Asn Thr Ser Leu Ala					
1175		1180		1185	
atc acg tgg aaa ggg ccc cca gac tgg aca gac tac aac gac ttt					3609
Ile Thr Trp Lys Gly Pro Pro Asp Trp Thr Asp Tyr Asn Asp Phe					
1190		1195		1200	
gag ctg cag tgg ttg ccc aga gat gca ctt act gtc ttc aac ccc					3654
Glu Leu Gln Trp Leu Pro Arg Asp Ala Leu Thr Val Phe Asn Pro					
1205		1210		1215	
tac aac aac aga aaa tca gaa gga cgc att gtg tat ggt ctt cgt					3699
Tyr Asn Asn Arg Lys Ser Glu Gly Arg Ile Val Tyr Gly Leu Arg					
1220		1225		1230	
cca ggg aga tcc tat caa ttc aac gtc aag act gtc agt ggt gat					3744
Pro Gly Arg Ser Tyr Gln Phe Asn Val Lys Thr Val Ser Gly Asp					
1235		1240		1245	
tcc tgg aaa act tac agc aaa cca att ttt gga tct gtg agg aca					3789
Ser Trp Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Ile Phe Gly Ser Val Arg Thr					
1250		1255		1260	
aag cct gac aag ata caa aac ctg cat tgc cgg cct cag aac tcc					3834
Lys Pro Asp Lys Ile Gln Asn Leu His Cys Arg Pro Gln Asn Ser					
1265		1270		1275	
acg gcc att gcc tgt tct tgg atc cct cct gat tct gac ttt gat					3879
Thr Ala Ile Ala Cys Ser Trp Ile Pro Pro Asp Ser Asp Phe Asp					
1280		1285		1290	
ggt tat agt att gaa tgc cgg aaa atg gac acc caa gaa gtt gag					3924
Gly Tyr Ser Ile Glu Cys Arg Lys Met Asp Thr Gln Glu Val Glu					
1295		1300		1305	
ttt tcc aga aag ctg gag aaa gaa aaa tct ctg ctc aac atc atg					3969
Phe Ser Arg Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Leu Leu Asn Ile Met					
1310		1315		1320	
atg cta gtg ccc cat aag agg tac ctg gtg tcc atc aaa gtg cag					4014
Met Leu Val Pro His Lys Arg Tyr Leu Val Ser Ile Lys Val Gln					
1325		1330		1335	
tcg gcc ggc atg acc agc gag gtg gtt gaa gac agc act atc aca					4059
Ser Ala Gly Met Thr Ser Glu Val Val Glu Asp Ser Thr Ile Thr					
1340		1345		1350	
atg ata gac cgc ccc cct cct cca ccc cca cac att cgt gtg aat					4104

ES 2 643 469 T3

Met Ile Asp Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ile Arg Val Asn
 1355 1360 1365

gaa aag gat gtg cta att agc aag tct tcc atc aac ttt act gtc 4149
 Glu Lys Asp Val Leu Ile Ser Lys Ser Ser Ile Asn Phe Thr Val
 1370 1375 1380

aac tgc agc tgg ttc agc gac acc aat gga gct gtg aaa tac ttc 4194
 Asn Cys Ser Trp Phe Ser Asp Thr Asn Gly Ala Val Lys Tyr Phe
 1385 1390 1395

aca gtg gtg gtg aga gag gct gat ggc agt gat gag ctg aag cca 4239
 Thr Val Val Val Arg Glu Ala Asp Gly Ser Asp Glu Leu Lys Pro
 1400 1405 1410

gaa cag cag cac cct ctc cct tcc tac ctg gag tac agg cac aat 4284
 Glu Gln Gln His Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Glu Tyr Arg His Asn
 1415 1420 1425

gcc tcc att cgg gtg tat cag act aat tat ttt gcc agc aaa tgt 4329
 Ala Ser Ile Arg Val Tyr Gln Thr Asn Tyr Phe Ala Ser Lys Cys
 1430 1435 1440

gcc gaa aat cct aac agc aac tcc aag agt ttt aac att aag ctt 4374
 Ala Glu Asn Pro Asn Ser Asn Ser Lys Ser Phe Asn Ile Lys Leu
 1445 1450 1455

gga gca gag atg gag agc cta ggt gga aaa tgc gat ccc act cag 4419
 Gly Ala Glu Met Glu Ser Leu Gly Gly Lys Cys Asp Pro Thr Gln
 1460 1465 1470

caa aaa ttc tgt gat gga cca ctg aag cca cac act gcc tac aga 4464
 Gln Lys Phe Cys Asp Gly Pro Leu Lys Pro His Thr Ala Tyr Arg
 1475 1480 1485

atc agc att cga gct ttt aca cag ctc ttt gat gag gac ctg aag 4509
 Ile Ser Ile Arg Ala Phe Thr Gln Leu Phe Asp Glu Asp Leu Lys
 1490 1495 1500

gaa ttc aca aag cca ctc tat tca gac aca ttt ttt tct tta ccc 4554
 Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Leu Pro
 1505 1510 1515

atc act act gaa tca gag ccc ttg ttt gga gct att gaa cgc ggc 4599
 Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly Ala Ile Glu Arg Gly
 1520 1525 1530

cgc cat cat cat cat cac gga 4623
 Arg His His His His His Gly
 1535 1540

<210> 2
 <211> 1541
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Leu Ser His Gly Ala Gly Leu Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Leu
 1 5 10 15

10

ES 2 643 469 T3

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
 20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
 35 40 45

Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
 50 55 60

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
 65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
 85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
 100 105 110

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

His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val
 130 135 140

Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly
 165 170 175

Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser
 180 185 190

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205

Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His
 210 215 220

Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly
 225 230 235 240

Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala
 245 250 255

Phe His Gly Leu Thr Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr
 260 265 270

ES 2 643 469 T3

Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285
 Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
 290 295 300
 Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
 325 330 335
 Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350
 Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
 355 360 365
 Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg
 370 375 380
 Val Lys His Ala Asn Glu Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 Val Ala Glu Trp Glu Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu
 405 410 415
 Leu Leu Ile His Lys Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe
 420 425 430
 Thr Asp Leu Val Pro Gly Arg Lys Tyr Met Ala Thr Val Thr Ser Ile
 435 440 445
 Ser Gly Asp Leu Lys Asn Ser Ser Ser Val Lys Gly Arg Thr Val Pro
 450 455 460
 Ala Gln Val Thr Asp Leu His Val Ala Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser
 465 470 475 480
 Leu Phe Thr Asn Trp Thr Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln
 485 490 495
 Val Leu Leu Ile His Glu Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser
 500 505 510
 Ser Glu Thr Ser Arg Tyr Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu
 515 520 525

ES 2 643 469 T3

Tyr Ser Val Val Val Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln
 530 535 540

Val Val Val Glu Gly Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr
 545 550 555 560

Val Asn Asn Ser Gly Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Leu
 565 570 575

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

Lys Val Val Gln Ser Leu Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser
 595 600 605

Phe Ser Ser Leu Thr Pro Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr
 610 615 620

Arg Ser Gly Lys Tyr Glu Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val
 625 630 635 640

Pro Asp Lys Val Gln Gly Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp
 645 650 655

Tyr Leu Arg Val Ser Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr
 660 665 670

Glu Val Thr Ile Lys Asn Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile
 675 680 685

Pro Lys Ser Glu Asn Glu Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg
 690 695 700

Leu Tyr Ser Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn
 705 710 715 720

Glu Gln Gly Asn Gly Arg Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr
 725 730 735

Leu Arg Asn Arg Ser Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala
 740 745 750

Asn Gly Asp Val Asp Gln Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met
 755 760 765

Lys Val Phe Pro Pro Phe His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg

ES 2 643 469 T3

Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Asn Leu Gln Glu
1025 1030 1035

Arg Ala Gln Val Asp Pro Leu Val Gln Ser Phe Ser Phe Gln Asn
1040 1045 1050

Leu Leu Gln Gly Arg Met Tyr Lys Met Val Ile Val Thr His Ser
1055 1060 1065

Gly Glu Leu Ser Asn Glu Ser Phe Ile Phe Gly Arg Thr Val Pro
1070 1075 1080

Ala Ser Val Ser His Leu Arg Gly Ser Asn Arg Asn Thr Thr Asp
1085 1090 1095

Ser Leu Trp Phe Asn Trp Ser Pro Ala Ser Gly Asp Phe Asp Phe
1100 1105 1110

Tyr Glu Leu Ile Leu Tyr Asn Pro Asn Gly Thr Lys Lys Glu Asn
1115 1120 1125

Trp Lys Asp Lys Asp Leu Thr Glu Trp Arg Phe Gln Gly Leu Val
1130 1135 1140

Pro Gly Arg Lys Tyr Val Leu Trp Val Val Thr His Ser Gly Asp
1145 1150 1155

Leu Ser Asn Lys Val Thr Ala Glu Ser Arg Thr Ala Pro Ser Pro
1160 1165 1170

Pro Ser Leu Met Ser Phe Ala Asp Ile Ala Asn Thr Ser Leu Ala
1175 1180 1185

Ile Thr Trp Lys Gly Pro Pro Asp Trp Thr Asp Tyr Asn Asp Phe
1190 1195 1200

Glu Leu Gln Trp Leu Pro Arg Asp Ala Leu Thr Val Phe Asn Pro
1205 1210 1215

Tyr Asn Asn Arg Lys Ser Glu Gly Arg Ile Val Tyr Gly Leu Arg
1220 1225 1230

Pro Gly Arg Ser Tyr Gln Phe Asn Val Lys Thr Val Ser Gly Asp
1235 1240 1245

Ser Trp Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Ile Phe Gly Ser Val Arg Thr
1250 1255 1260

ES 2 643 469 T3

Lys Pro Asp Lys Ile Gln Asn Leu His Cys Arg Pro Gln Asn Ser
 1265 1270 1275

 Thr Ala Ile Ala Cys Ser Trp Ile Pro Pro Asp Ser Asp Phe Asp
 1280 1285 1290

 Gly Tyr Ser Ile Glu Cys Arg Lys Met Asp Thr Gln Glu Val Glu
 1295 1300 1305

 Phe Ser Arg Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Leu Leu Asn Ile Met
 1310 1315 1320

 Met Leu Val Pro His Lys Arg Tyr Leu Val Ser Ile Lys Val Gln
 1325 1330 1335

 Ser Ala Gly Met Thr Ser Glu Val Val Glu Asp Ser Thr Ile Thr
 1340 1345 1350

 Met Ile Asp Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ile Arg Val Asn
 1355 1360 1365

 Glu Lys Asp Val Leu Ile Ser Lys Ser Ser Ile Asn Phe Thr Val
 1370 1375 1380

 Asn Cys Ser Trp Phe Ser Asp Thr Asn Gly Ala Val Lys Tyr Phe
 1385 1390 1395

 Thr Val Val Val Arg Glu Ala Asp Gly Ser Asp Glu Leu Lys Pro
 1400 1405 1410

 Glu Gln Gln His Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Glu Tyr Arg His Asn
 1415 1420 1425

 Ala Ser Ile Arg Val Tyr Gln Thr Asn Tyr Phe Ala Ser Lys Cys
 1430 1435 1440

 Ala Glu Asn Pro Asn Ser Asn Ser Lys Ser Phe Asn Ile Lys Leu
 1445 1450 1455

 Gly Ala Glu Met Glu Ser Leu Gly Gly Lys Cys Asp Pro Thr Gln
 1460 1465 1470

 Gln Lys Phe Cys Asp Gly Pro Leu Lys Pro His Thr Ala Tyr Arg
 1475 1480 1485

 Ile Ser Ile Arg Ala Phe Thr Gln Leu Phe Asp Glu Asp Leu Lys
 1490 1495 1500

 Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Leu Pro
 1505 1510 1515

 Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly Ala Ile Glu Arg Gly
 1520 1525 1530

 Arg His His His His His His Gly
 1535 1540

ES 2 643 469 T3

<210> 3
 <211> 1621
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3
 Met Leu Ser His Gly Ala Gly Leu Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
 20 25 30
 Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
 35 40 45
 Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
 50 55 60
 Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
 65 70 75 80
 Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
 85 90 95
 Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
 100 105 110
 Pro Ala Arg Phe Gly Val Ser Lys Glu Lys Thr Thr Ser Thr Gly Leu
 115 120 125
 His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val
 130 135 140
 Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly
 165 170 175

ES 2 643 469 T3

Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser
 180 185 190

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205

Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His
 210 215 220

Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly
 225 230 235 240

Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala
 245 250 255

Phe His Gly Leu Ser Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr
 260 265 270

Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
 290 295 300

Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320

Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
 325 330 335

Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
 355 360 365

Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Pro Asp Lys Val Ala Asn Leu Glu
 370 375 380

Ala Asn Asn Asn Gly Arg Met Arg Ser Leu Val Val Ser Trp Ser Pro
 385 390 395 400

Pro Ala Gly Asp Trp Glu Gln Tyr Arg Ile Leu Leu Phe Asn Asp Ser
 405 410 415

Val Val Leu Leu Asn Ile Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr Gln Tyr Val

ES 2 643 469 T3

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

ES 2 643 469 T3

Thr Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Thr Val Ser Ala Phe Arg
 930 935 940

His Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile Pro Lys His Val Phe Glu
 945 950 955 960

His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Glu Gln Tyr Gln Ile Met Ile
 965 970 975

Ala Ser Val Ser Gly Ser Leu Lys Asn Gln Ile Asn Val Val Gly Arg
 980 985 990

Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly Val Ile Ala Asp Asn Ala Tyr Ser
 995 1000 1005

Ser Tyr Ser Leu Ile Val Ser Trp Gln Lys Ala Ala Gly Val Ala
 1010 1015 1020

Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu Leu Thr Glu Asn Gly Ile Leu Leu
 1025 1030 1035

Arg Asn Thr Ser Glu Pro Ala Thr Thr Lys Gln His Lys Phe Glu
 1040 1045 1050

Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys Tyr Lys Ile Gln Ile Leu Thr Val
 1055 1060 1065

Ser Gly Gly Leu Phe Ser Lys Glu Ala Gln Thr Glu Gly Arg Thr
 1070 1075 1080

Val Pro Ala Ala Val Thr Asp Leu Arg Ile Thr Glu Asn Ser Thr
 1085 1090 1095

Arg His Leu Ser Phe Arg Trp Thr Ala Ser Glu Gly Glu Leu Ser
 1100 1105 1110

Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Asn Leu Gln Glu
 1115 1120 1125

Arg Ala Gln Val Asp Pro Leu Val Gln Ser Phe Ser Phe Gln Asn
 1130 1135 1140

Leu Leu Gln Gly Arg Met Tyr Lys Met Val Ile Val Thr His Ser
 1145 1150 1155

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

ES 2 643 469 T3

Ala Ser Val Ser His Leu Arg Gly Ser Asn Arg Asn Thr Thr Asp
1175 1180 1185

Ser Leu Trp Phe Asn Trp Ser Pro Ala Ser Gly Asp Phe Asp Phe
1190 1195 1200

Tyr Glu Leu Ile Leu Tyr Asn Pro Asn Gly Thr Lys Lys Glu Asn
1205 1210 1215

Trp Lys Asp Lys Asp Leu Thr Glu Trp Arg Phe Gln Gly Leu Val
1220 1225 1230

Pro Gly Arg Lys Tyr Val Leu Trp Val Val Thr His Ser Gly Asp
1235 1240 1245

Leu Ser Asn Lys Val Thr Ala Glu Ser Arg Thr Ala Pro Ser Pro
1250 1255 1260

Pro Ser Leu Met Ser Phe Ala Asp Ile Ala Asn Thr Ser Leu Ala
1265 1270 1275

Ile Thr Trp Lys Gly Pro Pro Asp Trp Thr Asp Tyr Asn Asp Phe
1280 1285 1290

Glu Leu Gln Trp Leu Pro Arg Asp Ala Leu Thr Val Phe Asn Pro
1295 1300 1305

Tyr Asn Asn Arg Lys Ser Glu Gly Arg Ile Val Tyr Gly Leu Arg
1310 1315 1320

Pro Gly Arg Ser Tyr Gln Phe Asn Val Lys Thr Val Ser Gly Asp
1325 1330 1335

Ser Trp Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Ile Phe Gly Ser Val Arg Thr
1340 1345 1350

Lys Pro Asp Lys Ile Gln Asn Leu His Cys Arg Pro Gln Asn Ser
1355 1360 1365

Thr Ala Ile Ala Cys Ser Trp Ile Pro Pro Asp Ser Asp Phe Asp
1370 1375 1380

Gly Tyr Ser Ile Glu Cys Arg Lys Met Asp Thr Gln Glu Val Glu
1385 1390 1395

Phe Ser Arg Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Leu Leu Asn Ile Met

ES 2 643 469 T3

<400> 4

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

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
 20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
 35 40 45

Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
 50 55 60

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
 65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
 85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
 100 105 110

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

His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val
 130 135 140

Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly
 165 170 175

Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser
 180 185 190

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205

Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His
 210 215 220

Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly
 225 230 235 240

ES 2 643 469 T3

Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala
 245 250 255

Phe His Gly Leu Thr Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr
 260 265 270

Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
 290 295 300

Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320

Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
 325 330 335

Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
 355 360 365

Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg
 370 375 380

Val Lys His Ala Asn Glu Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro
 385 390 395 400

Val Ala Glu Trp Glu Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu
 405 410 415

Leu Leu Ile His Lys Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe
 420 425 430

Thr Asp Leu Val Pro Gly Arg Lys Tyr Met Ala Thr Val Thr Ser Ile
 435 440 445

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

Ala Gln Val Thr Asp Leu His Val Ala Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser
 465 470 475 480

Leu Phe Thr Asn Trp Thr Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln
 485 490 495

ES 2 643 469 T3

Val Leu Leu Ile His Glu Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser
500 505 510

Ser Glu Thr Ser Arg Tyr Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu
515 520 525

Tyr Ser Val Val Val Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln
530 535 540

Val Val Val Glu Gly Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr
545 550 555 560

Val Asn Asn Ser Gly Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Leu
565 570 575

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

Lys Val Val Gln Ser Leu Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser
595 600 605

Phe Ser Ser Leu Thr Pro Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr
610 615 620

Arg Ser Gly Lys Tyr Glu Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val
625 630 635 640

Pro Asp Lys Val Gln Gly Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp
645 650 655

Tyr Leu Arg Val Ser Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr
660 665 670

Glu Val Thr Ile Lys Asn Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile
675 680 685

Pro Lys Ser Glu Asn Glu Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg
690 695 700

Leu Tyr Ser Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn
705 710 715 720

Glu Gln Gly Asn Gly Arg Thr Ile Pro Glu Lys Gly Asn Ser Ala Asp
725 730 735

Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu
740 745 750

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr
755 760 765

Gly His His His His His His
770 775

5 <210> 5
<211> 421

ES 2 643 469 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

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

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
 20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
 35 40 45

Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
 50 55 60

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
 65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
 85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
 100 105 110

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

His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val
 130 135 140

Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly
 165 170 175

Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser
 180 185 190

5

ES 2 643 469 T3

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205

Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His
 210 215 220

Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly
 225 230 235 240

Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala
 245 250 255

Phe His Gly Leu Thr Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr
 260 265 270

Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
 290 295 300

Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320

Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
 325 330 335

Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
 355 360 365

Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile Gln
 370 375 380

His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly Lys
 385 390 395 400

Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His
 405 410 415

His His His His His
 420

- <210> 6
- 5 <211> 247
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

ES 2 643 469 T3

<400> 6

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

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
35 40 45

Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
50 55 60

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
100 105 110

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

His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val
130 135 140

Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln
145 150 155 160

Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly
165 170 175

Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser
180 185 190

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Lys Gly Asn Ser Ala Asp
195 200 205

Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu
210 215 220

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr
225 230 235 240

Gly His His His His His His
245

5

<210> 7

<211> 1632

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

ES 2 643 469 T3

<400> 7

Met Leu Arg His Gly Ala Leu Thr Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Val
1 5 10 15

Val Gln Thr Gly Val Ala Glu Gln Val Lys Cys Asn Phe Thr Leu Leu
20 25 30

Glu Ser Arg Val Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gln Trp Arg Thr Phe
35 40 45

Ala Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Ser Gly
50 55 60

Pro Met Trp Cys His Pro Ile Arg Ile Asp Asn Phe Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

Asn Pro Lys Asp Leu Gln Ala Gly Thr Val Tyr Asn Phe Arg Ile Val
85 90 95

Ser Leu Asp Gly Glu Glu Ser Thr Leu Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu
100 105 110

Pro Pro Ala Arg Phe Glu Val Asn Arg Glu Lys Thr Ala Ser Thr Thr
115 120 125

Leu Gln Val Arg Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Ser Trp Tyr Glu
130 135 140

Val Gln Leu Phe Asp His Asn Asn Gln Lys Ile Gln Glu Val Gln Val
145 150 155 160

Gln Glu Ser Thr Thr Trp Ser Gln Tyr Thr Phe Leu Asn Leu Thr Glu
165 170 175

Gly Asn Ser Tyr Lys Val Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Glu Lys Arg
180 185 190

Ser Phe Pro Val Tyr Ile Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys

ES 2 643 469 T3

Val Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly
450 455 460

Arg Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn
465 470 475 480

Glu Thr Ser Leu Gly Ile Thr Trp Arg Ala Pro Leu Gly Glu Trp Glu
485 490 495

Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Met Asp Arg Glu Leu Leu Val Ile His Lys
500 505 510

Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Met Pro
515 520 525

Gly Arg Asn Tyr Lys Ala Thr Val Thr Ser Met Ser Gly Asp Leu Lys
530 535 540

Gln Ser Ser Ser Ile Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp
545 550 555 560

Leu His Val Asn Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp
565 570 575

Thr Lys Ala Leu Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His
580 585 590

Glu Asn Val Val Val Lys Asn Glu Ser Val Ser Ser Asp Thr Ser Arg
595 600 605

Tyr Ser Phe Arg Ala Leu Lys Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val
610 615 620

Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Ala Glu Gly
625 630 635 640

Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly
645 650 655

Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Pro Ala Pro Gly Glu Val
660 665 670

Asp His Tyr Val Val Ser Leu Ser His Glu Gly Lys Val Asp Gln Phe
675 680 685

Leu Ile Ile Ala Lys Ser Val Ser Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr
690 695 700

ES 2 643 469 T3

Pro Gly Arg Leu Tyr Asn Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Asn Tyr
 705 710 715 720
 Ala Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln
 725 730 735
 Gly Ile Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Lys Val Ser
 740 745 750
 Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys
 755 760 765
 Asn Arg Glu Ser Phe Ile Gln Thr Lys Thr Ile Pro Lys Ser Glu Asn
 770 775 780
 Glu Cys Glu Phe Ile Glu Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr
 785 790 795 800
 Val Ser Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Ser Glu Gln Gly Thr Gly
 805 810 815
 Arg Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Leu Asn Arg Ser
 820 825 830
 Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Arg Ala Asn Gly Asp Val Asp
 835 840 845
 Gln Tyr Glu Val Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro His
 850 855 860
 Ile His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Thr
 865 870 875 880
 Pro Gly Arg His Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val
 885 890 895
 Gln Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Leu Thr Val Pro Ser Thr Val Lys
 900 905 910
 Asn Ile His Ile Ser Ala Asn Gly Ala Thr Asp Arg Leu Met Val Thr
 915 920 925
 Trp Ser Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Val Val Ser Ala Phe
 930 935 940
 Arg Gln Asp Glu Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile Pro Lys His Ala Ser
 945 950 955 960

ES 2 643 469 T3

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

ES 2 643 469 T3

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

ES 2 643 469 T3

Gln Ser Ala Gly Met Thr Ser Glu Val Val Glu Asp Ser Thr Ile
 1430 1435 1440

Thr Met Ile Asp Arg Pro Pro Gln Pro Pro Pro His Ile Arg Val
 1445 1450 1455

Asn Glu Lys Asp Val Leu Ile Ser Lys Ser Ser Ile Asn Phe Thr
 1460 1465 1470

Val Asn Cys Ser Trp Phe Ser Asp Thr Asn Gly Ala Val Lys Tyr
 1475 1480 1485

Phe Ala Val Val Val Arg Glu Ala Asp Ser Met Asp Glu Leu Lys
 1490 1495 1500

Pro Glu Gln Gln His Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Glu Tyr Arg His
 1505 1510 1515

Asn Ala Ser Ile Arg Val Tyr Gln Thr Asn Tyr Phe Ala Ser Lys
 1520 1525 1530

Cys Ala Glu Ser Pro Asp Ser Ser Ser Lys Ser Phe Asn Ile Lys
 1535 1540 1545

Leu Gly Ala Glu Met Asp Ser Leu Gly Gly Lys Cys Asp Pro Ser
 1550 1555 1560

Gln Gln Lys Phe Cys Asp Gly Pro Leu Lys Pro His Thr Ala Tyr
 1565 1570 1575

Arg Ile Ser Ile Arg Ala Phe Thr Gln Leu Phe Asp Glu Asp Leu
 1580 1585 1590

Lys Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Met
 1595 1600 1605

Pro Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly Val Ile Glu Arg
 1610 1615 1620

Gly Arg His His His His His His Gly
 1625 1630

<210> 8

<211> 774

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> molécula quimérica de humano y ratón

10

ES 2 643 469 T3

<400> 8

Met Leu Arg His Gly Ala Leu Thr Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Val
 1 5 10 15

Val Gln Thr Gly Val Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
 20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
 35 40 45

Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
 50 55 60

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
 65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
 85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
 100 105 110

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

Gln Val Arg Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Ser Trp Tyr Glu Val
 130 135 140

Gln Leu Phe Asp His Asn Asn Gln Lys Ile Gln Glu Val Gln Val Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Thr Thr Trp Ser Gln Tyr Thr Phe Leu Asn Leu Thr Glu Gly
 165 170 175

Asn Ser Tyr Lys Val Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Glu Lys Arg Ser
 180 185 190

Phe Pro Val Tyr Ile Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205

Leu Gly Ile Ser Pro Asn Pro Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Arg
 210 215 220

Gly Ser Gly Asn Val Glu Gln Tyr Arg Leu Val Leu Met Asp Lys Gly
 225 230 235 240

ES 2 643 469 T3

Ala Ile Val Gln Asp Thr Asn Val Asp Arg Arg Asp Thr Ser Tyr Ala
 245 250 255

Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val Thr
 260 265 270

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

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu Thr
 290 295 300

Ser Leu Asn Val Lys Trp Gln Lys Pro Pro Gly Asp Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320

Ser Ile Thr Leu Ser His Gln Gly Thr Ile Lys Glu Ser Lys Thr Leu
 325 330 335

Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Gly Glu Leu Ser Ala Glu
 355 360 365

Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu Val
 370 375 380

Ser Tyr Asn Glu Ile Trp Met Lys Ser Phe Thr Val Asn Trp Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu Ser
 405 410 415

Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr Ala
 420 425 430

Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ile Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Ile Glu Val
 435 440 445

Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly Arg
 450 455 460

Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn Glu
 465 470 475 480

Thr Ser Leu Gly Ile Thr Trp Arg Ala Pro Leu Gly Glu Trp Glu Lys
 485 490 495

ES 2 643 469 T3

Tyr Ile Ile Ser Leu Met Asp Arg Glu Leu Leu Val Ile His Lys Ser
 500 505 510
 Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Met Pro Gly
 515 520 525
 Arg Asn Tyr Lys Ala Thr Val Thr Ser Met Ser Gly Asp Leu Lys Gln
 530 535 540
 Ser Ser Ser Ile Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp Leu
 545 550 555 560
 His Val Asn Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp Thr
 565 570 575
 Lys Ala Leu Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His Glu
 580 585 590
 Asn Val Val Val Lys Asn Glu Ser Val Ser Ser Asp Thr Ser Arg Tyr
 595 600 605
 Ser Phe Arg Ala Leu Lys Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr
 610 615 620
 Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Ala Glu Gly Arg
 625 630 635 640
 Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly Arg
 645 650 655
 Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Pro Ala Pro Gly Glu Val Asp
 660 665 670
 His Tyr Val Val Ser Leu Ser His Glu Gly Lys Val Asp Gln Phe Leu
 675 680 685
 Ile Ile Ala Lys Ser Val Ser Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr Pro
 690 695 700
 Gly Arg Leu Tyr Asn Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Asn Tyr Ala
 705 710 715 720
 Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile
 725 730 735
 Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly
 740 745 750
 Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly
 755 760 765
 His His His His His His
 770

5 <210> 9
 <211> 775

ES 2 643 469 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> molécula quimérica de humano y ratón

<400> 9

```

Met Leu Arg His Gly Ala Leu Thr Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Val
1           5           10           15

Val Gln Thr Gly Val Ala Glu Gln Val Lys Cys Asn Phe Thr Leu Leu
          20           25           30

Glu Ser Arg Val Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gln Trp Arg Thr Phe
          35           40           45

Ala Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Ser Gly
          50           55           60

Pro Met Trp Cys His Pro Ile Arg Ile Asp Asn Phe Thr Tyr Gly Cys
65           70           75           80

Asn Pro Lys Asp Leu Gln Ala Gly Thr Val Tyr Asn Phe Arg Ile Val
          85           90           95

Ser Leu Asp Gly Glu Glu Ser Thr Leu Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu
          100          105          110

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

Leu His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu
130          135          140

Val Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile
145          150          155          160

Gln Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala
          165          170          175
  
```

ES 2 643 469 T3

Gly Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg
 180 185 190

Ser Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys
 195 200 205

Asp Leu Gly Ile Ser Pro Asn Pro Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser
 210 215 220

Arg Gly Ser Gly Asn Val Glu Gln Tyr Arg Leu Val Leu Met Asp Lys
 225 230 235 240

Gly Ala Ile Val Gln Asp Thr Asn Val Asp Arg Arg Asp Thr Ser Tyr
 245 250 255

Ala Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val
 260 265 270

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

Ala Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu
 290 295 300

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

Tyr Ser Ile Thr Leu Ser His Gln Gly Thr Ile Lys Glu Ser Lys Thr
 325 330 335

Leu Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly
 340 345 350

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

Glu Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu
 370 375 380

Val Ser Tyr Asn Glu Ile Trp Met Lys Ser Phe Thr Val Asn Trp Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu
 405 410 415

Ser Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr
 420 425 430

ES 2 643 469 T3

Ala Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ile Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Ile Glu
 435 440 445

Val Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly
 450 455 460

Arg Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn
 465 470 475 480

Glu Thr Ser Leu Gly Ile Thr Trp Arg Ala Pro Leu Gly Glu Trp Glu
 485 490 495

Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Met Asp Arg Glu Leu Leu Val Ile His Lys
 500 505 510

Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Met Pro
 515 520 525

Gly Arg Asn Tyr Lys Ala Thr Val Thr Ser Met Ser Gly Asp Leu Lys
 530 535 540

Gln Ser Ser Ser Ile Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp
 545 550 555 560

Leu His Val Asn Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp
 565 570 575

Thr Lys Ala Leu Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His
 580 585 590

Glu Asn Val Val Val Lys Asn Glu Ser Val Ser Ser Asp Thr Ser Arg
 595 600 605

Tyr Ser Phe Arg Ala Leu Lys Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val
 610 615 620

Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Ala Glu Gly
 625 630 635 640

Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly
 645 650 655

Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Pro Ala Pro Gly Glu Val
 660 665 670

Asp His Tyr Val Val Ser Leu Ser His Glu Gly Lys Val Asp Gln Phe

ES 2 643 469 T3

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

His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val
 130 135 140

Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly
 165 170 175

Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser
 180 185 190

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205

Leu Gly Ile Ser Pro Asn Pro Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Arg
 210 215 220

Gly Ser Gly Asn Val Glu Gln Tyr Arg Leu Val Leu Met Asp Lys Gly
 225 230 235 240

Ala Ile Val Gln Asp Thr Asn Val Asp Arg Arg Asp Thr Ser Tyr Ala
 245 250 255

Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val Thr
 260 265 270

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

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu Thr
 290 295 300

Ser Leu Asn Val Lys Trp Gln Lys Pro Pro Gly Asp Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320

Ser Ile Thr Leu Ser His Gln Gly Thr Ile Lys Glu Ser Lys Thr Leu
 325 330 335

Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Gly Glu Leu Ser Ala Glu

ES 2 643 469 T3

Ser Phe Arg Ala Leu Lys Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr
610 615 620

Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Ala Glu Gly Arg
625 630 635 640

Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly Arg
645 650 655

Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Pro Ala Pro Gly Glu Val Asp
660 665 670

His Tyr Val Val Ser Leu Ser His Glu Gly Lys Val Asp Gln Phe Leu
675 680 685

Ile Ile Ala Lys Ser Val Ser Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr Pro
690 695 700

Gly Arg Leu Tyr Asn Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Asn Tyr Ala
705 710 715 720

Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile
725 730 735

Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly
740 745 750

Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly
755 760 765

His His His His His His
770

<210> 11

<211> 89

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala Glu Ser Lys Ala
1 5 10 15

Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu Gly Ser Pro Cys
20 25 30

Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly Ala Ala Leu Cys
35 40 45

10 Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys Asn Leu Gln Asp
50 55 60

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

Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp
85

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana (HPTP β), en donde el anticuerpo aislado es un anticuerpo monoclonal, en donde el anticuerpo monoclonal comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, en donde dicho anticuerpo aislado regula positivamente la angiogénesis, en donde el anticuerpo aislado se une a la primera repetición FN3 de HPTP β , en donde la primera repetición FN3 de HPTP β tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.
2. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, siendo el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma con n.º de ATCC PTA-7580.
- 10 3. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo aislado está humanizado.
4. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, que comprende regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma con n.º de ATCC PTA-7580 y que está humanizado.
- 15 5. Un fragmento de unión al antígeno aislado de un anticuerpo monoclonal que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana (HPTP β), en donde el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal es un fragmento Fab, en donde dicho fragmento de unión al antígeno regula negativamente la angiogénesis, en donde el fragmento de unión al antígeno se une a la primera repetición FN3 de HPTP β , en donde la primera repetición FN3 de HPTP β tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.
- 20 6. El fragmento de unión al antígeno según la reivindicación 5, siendo el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma con n.º de ATCC PTA-7580.
7. El fragmento de unión al antígeno según la reivindicación 5, en donde el fragmento de unión al antígeno está humanizado.
- 25 8. El fragmento de unión al antígeno según la reivindicación 5, comprendiendo el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma con n.º de ATCC PTA-7580 y que está humanizado.

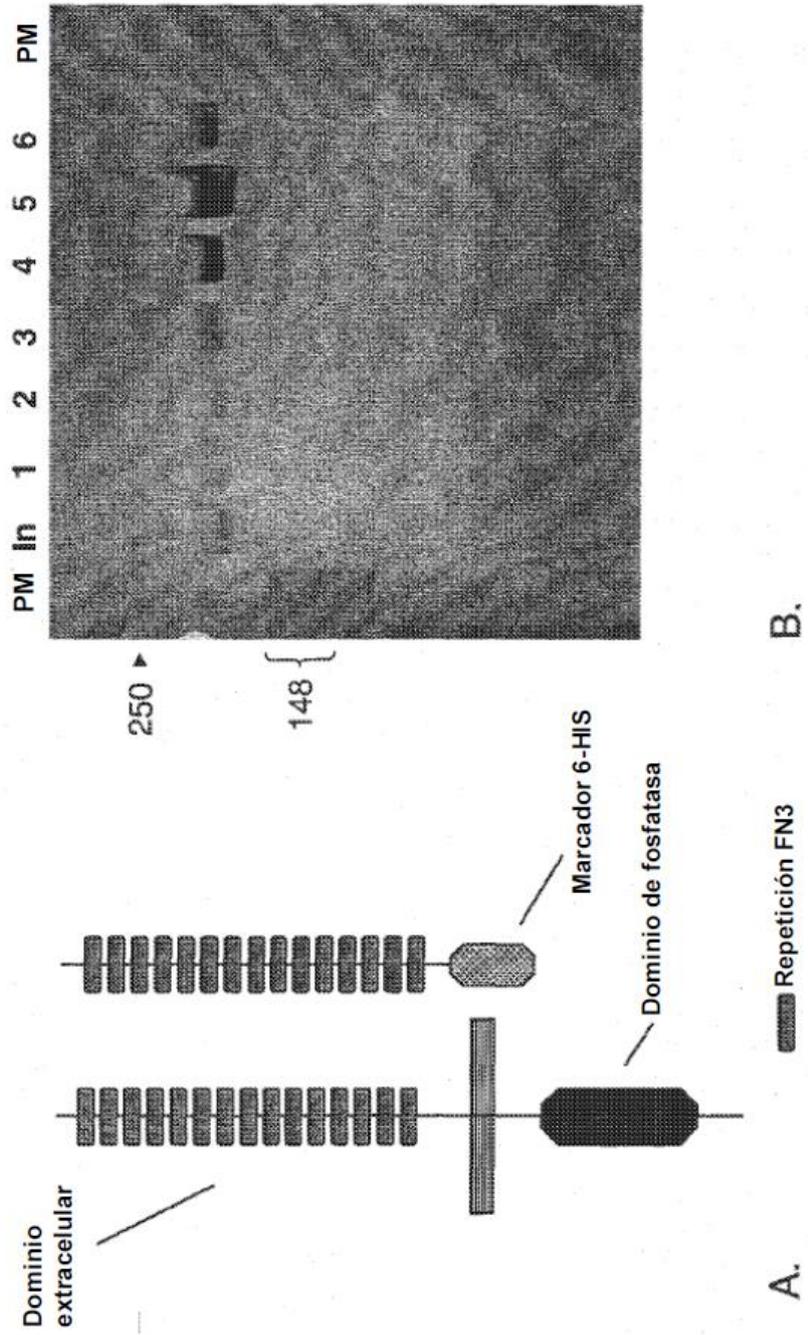


FIGURA 1

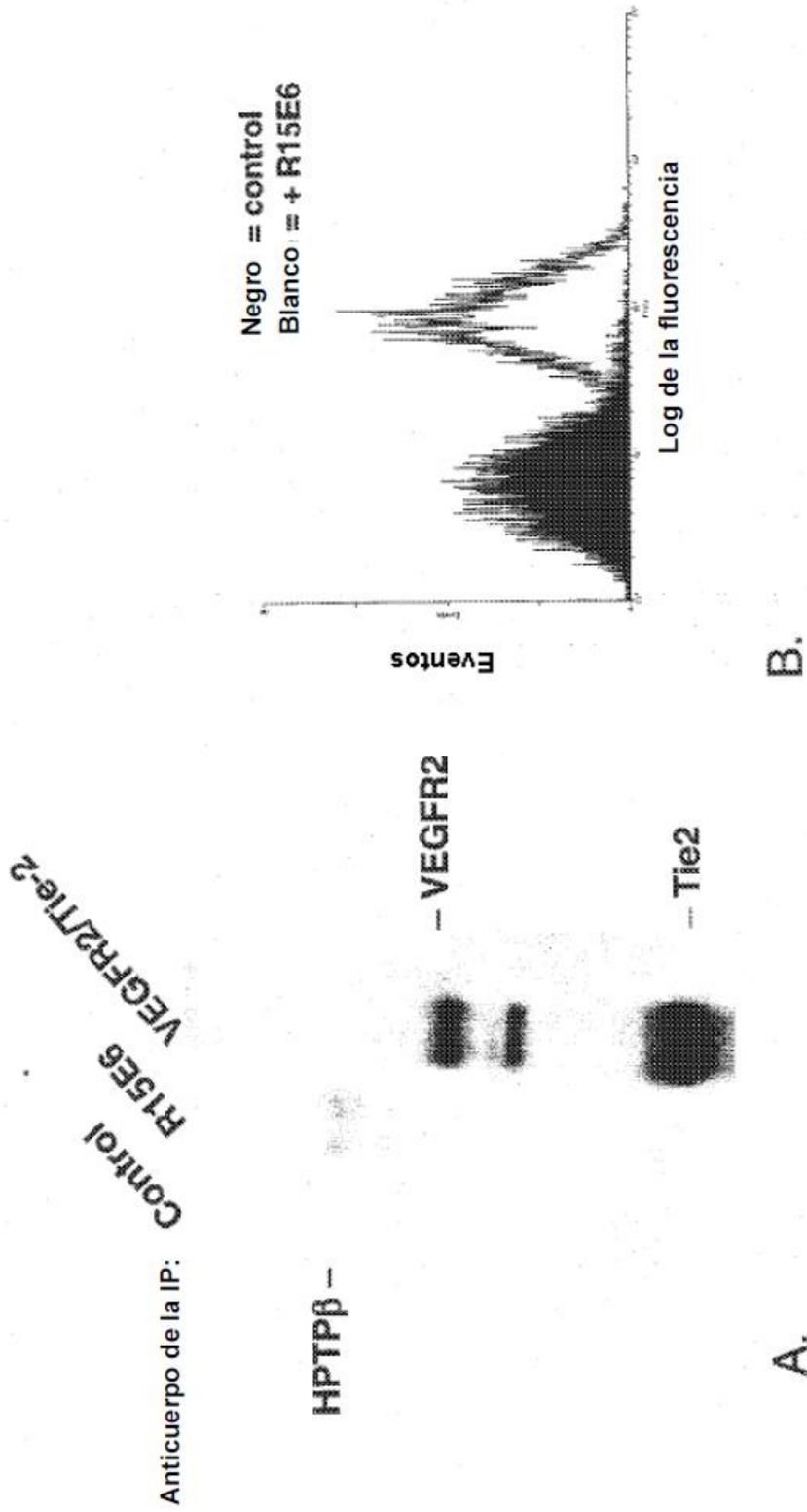


FIGURA 2

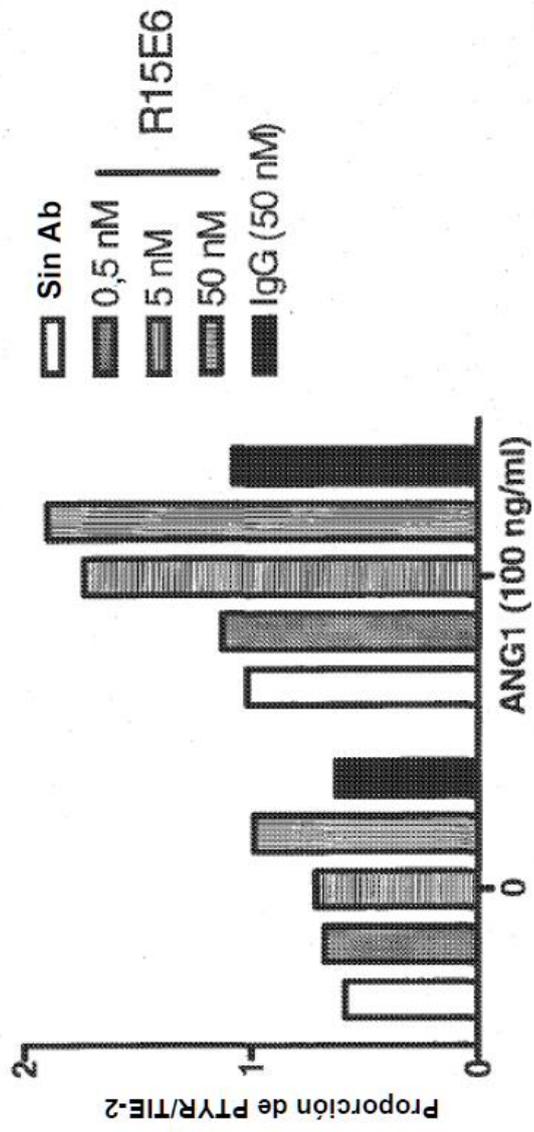


FIGURA 3

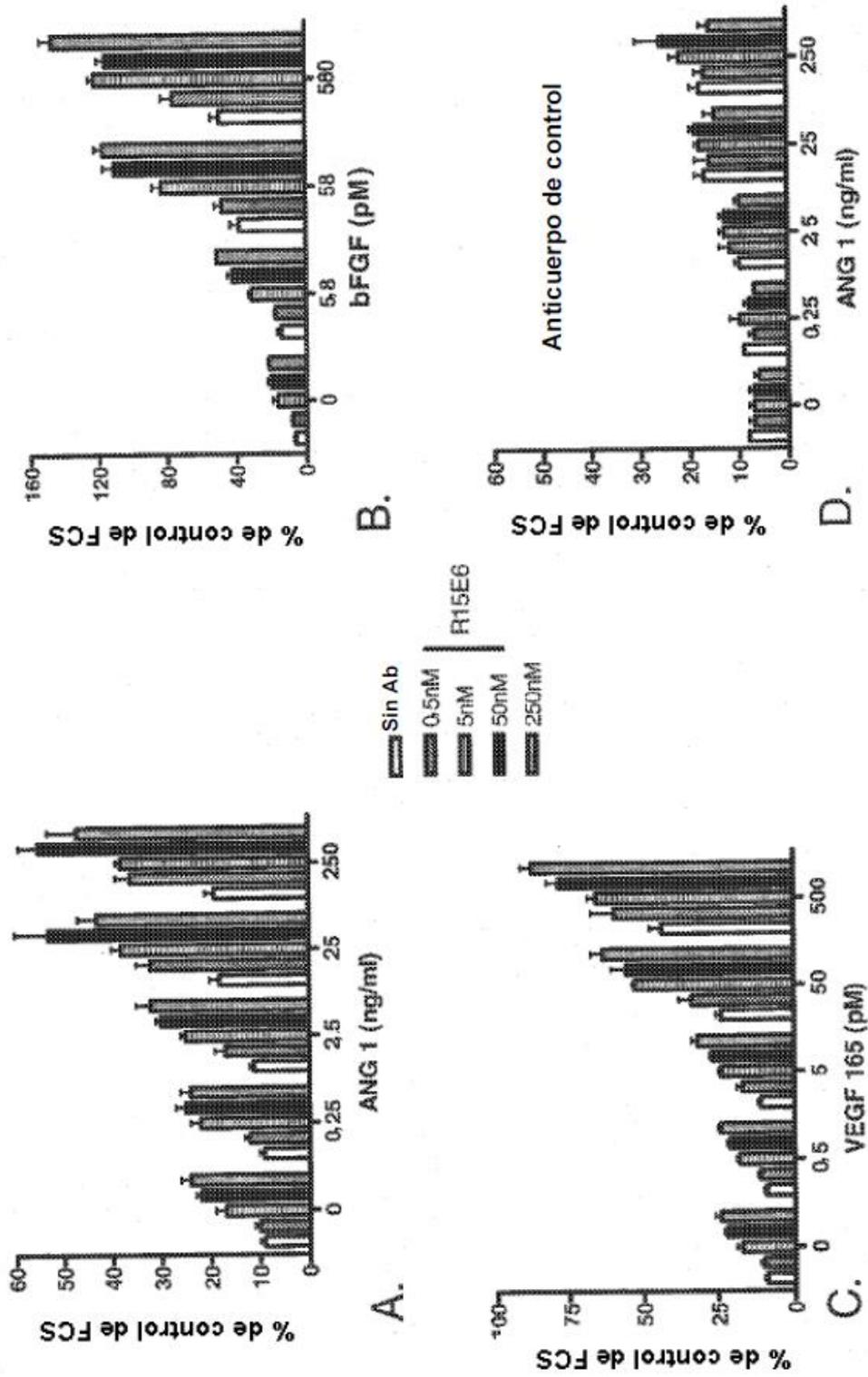


FIGURA 4

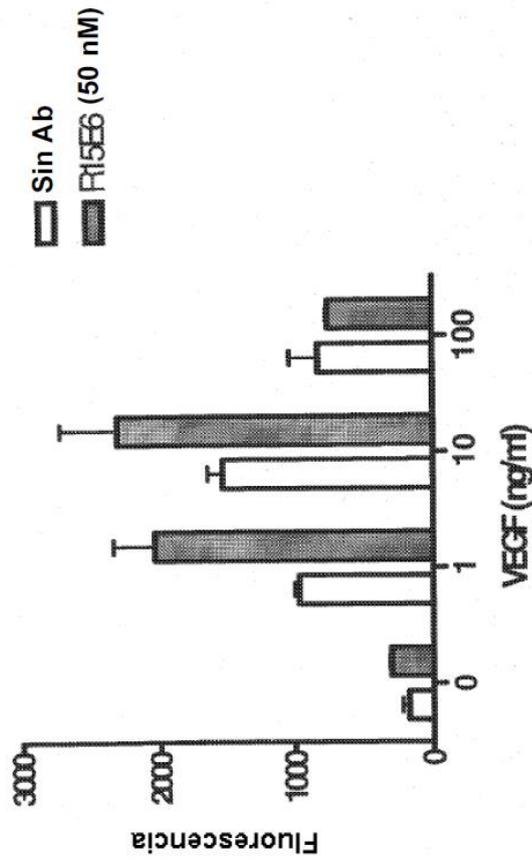


FIGURA 5

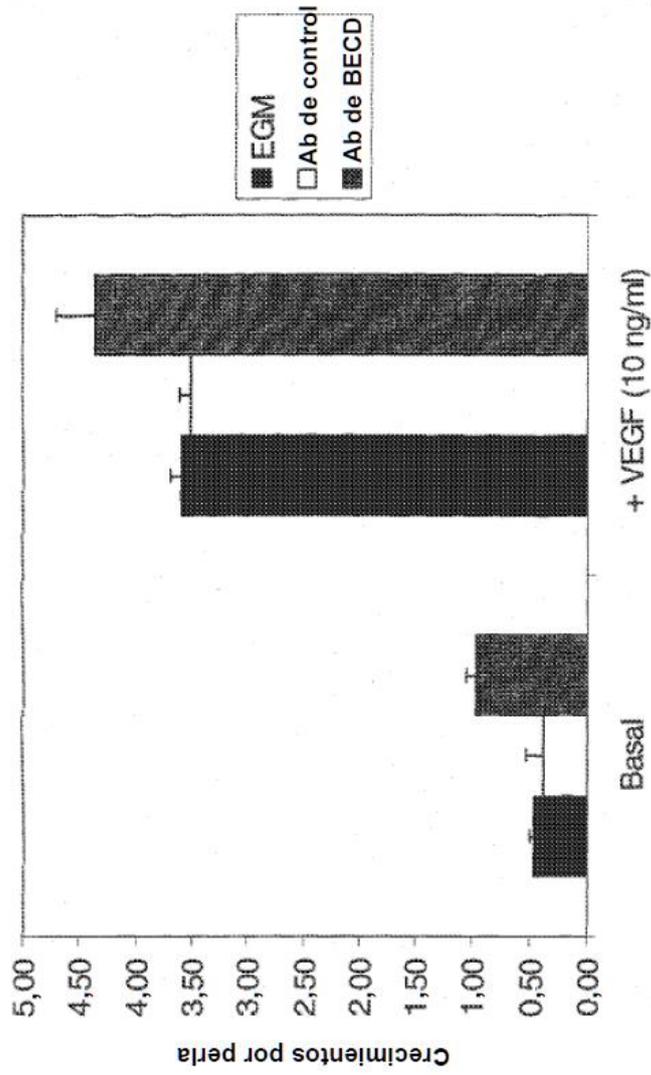


FIGURA 6

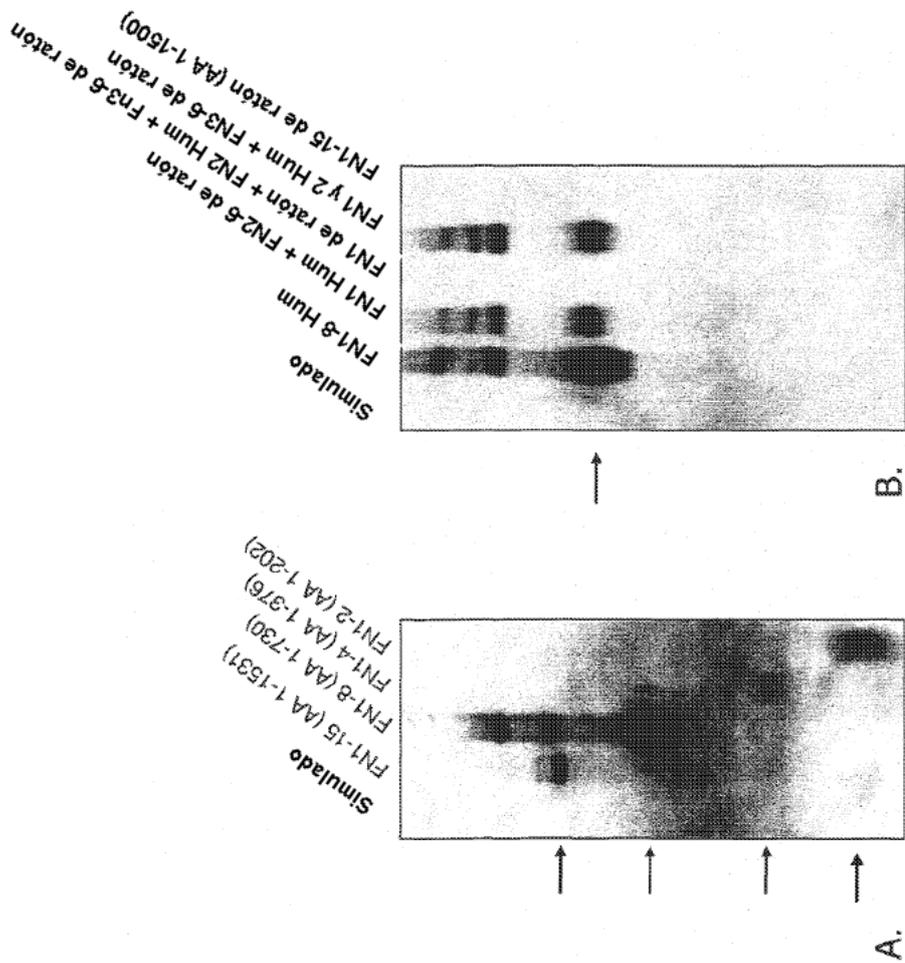
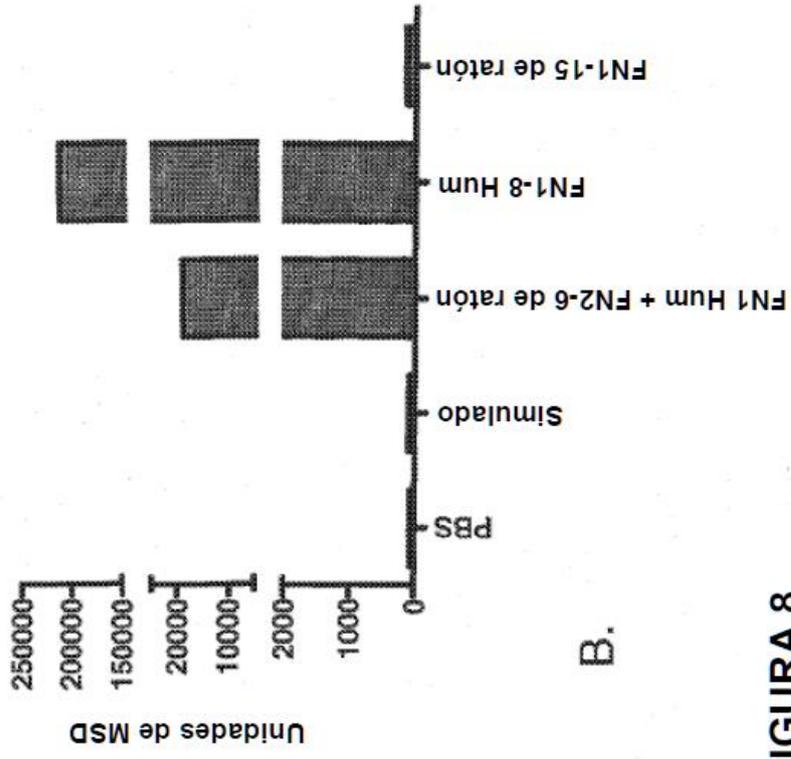
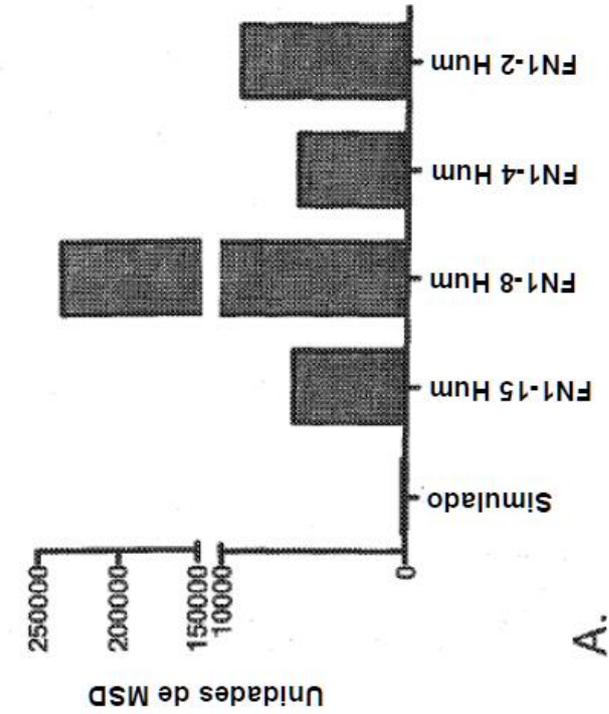


FIGURA 7

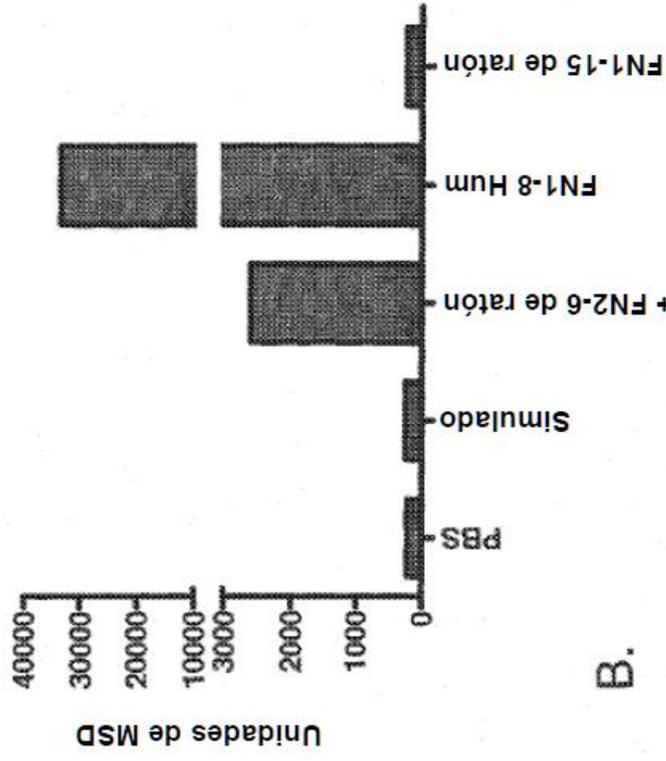


A.

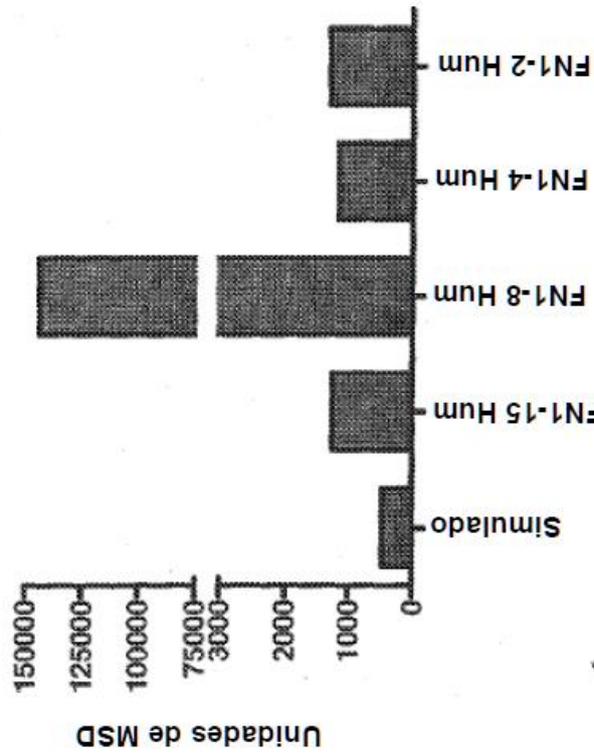


B.

FIGURA 8



A.



B.

FIGURA 9

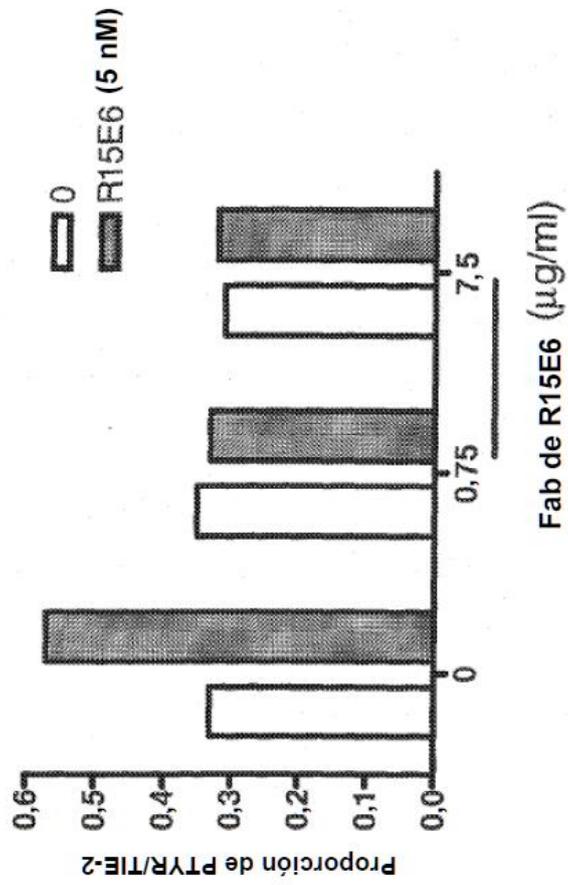
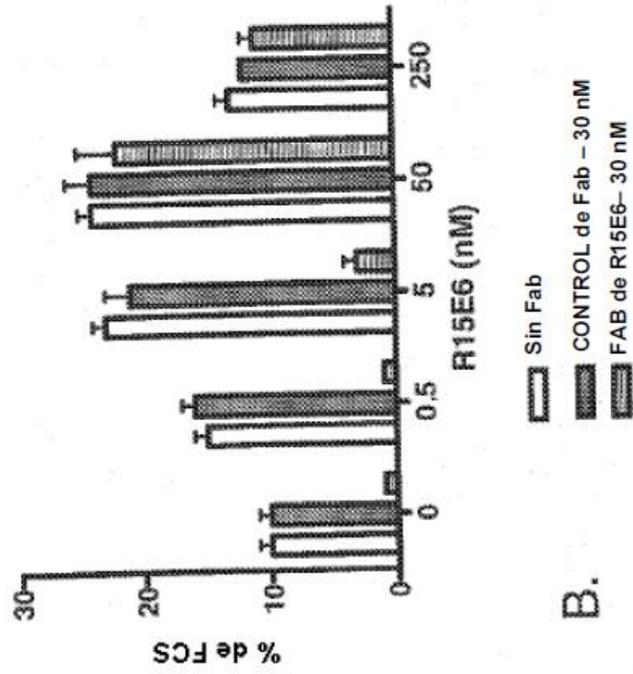
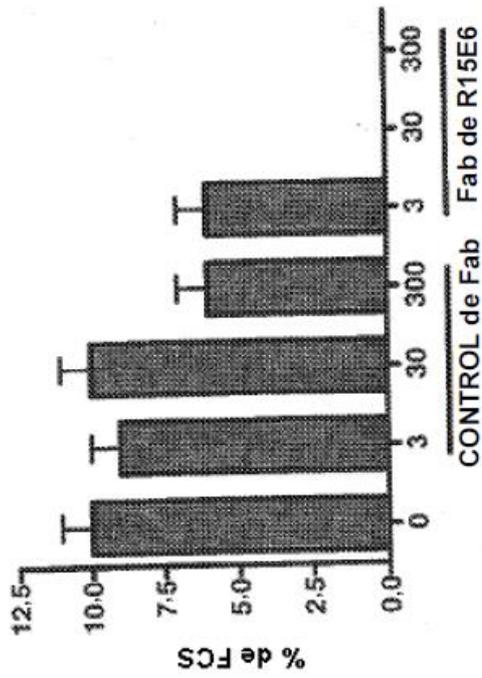


FIGURA 10



B.



A.

FIGURA 11

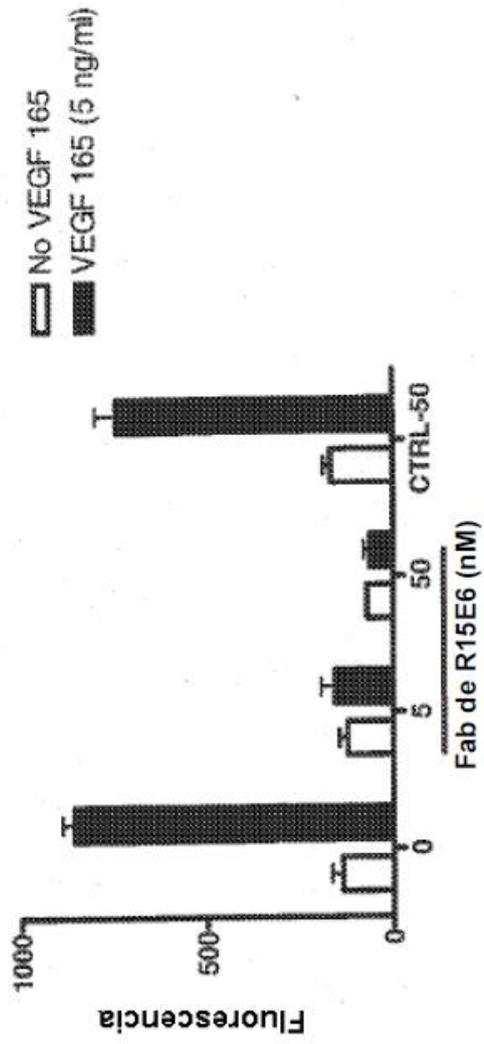


FIGURA 12