

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 264**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/81** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2015 PCT/US2015/046992**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16033212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2015 E 15757434 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3186276**

54 Título: **Variantes de inhibidor tisular de la metaloproteinasa tipo tres (TIMP-3), composiciones y métodos**

30 Prioridad:

**27.08.2014 US 201462042574 P**

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

**05.03.2020**

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)  
One Amgen Center Drive  
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**O'NEILL, JASON, C.;  
KETCHEM, RANDAL, R.;  
LEE, TAEWEON;  
CHINTALGATTU, VISHNU y  
STEVENS, JENNITTE, LEANN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 746 264 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

Variantes de inhibidor tisular de la metaloproteinasas tipo tres (TIMP-3), composiciones y métodos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a inhibidores de la metaloproteinasas. En particular, la invención se refiere a inhibidor tisular de la metaloproteinasas 3 ("TIMP-3") y a novedosas y útiles variantes, muteínas y sus derivados.

Antecedentes de la invención

10 Los tejidos conjuntivos y el cartílago articular se mantienen en equilibrio dinámico por los efectos opuestos de la síntesis y la degradación de la matriz extracelular. La degradación de la matriz se provoca principalmente por la acción enzimática de metaloproteinasas, que incluyen metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y desintegrina-metaloproteinasas con motivos de trombospondina (ADAMTSs). Mientras que estas enzimas son importantes en muchos procesos naturales (incluyendo desarrollo, morfogénesis, remodelación ósea, cicatrización y angiogénesis), se cree que la desregulación de estas enzimas que conducen a sus niveles elevados desempeña una función perjudicial en enfermedades degradativas de tejido conjuntivo, que incluyen artritis reumatoide y osteoartritis, así como en cáncer y afecciones cardiovasculares.

15 Los inhibidores endógenos de las metaloproteinasas incluyen alfa2-macroglobulina plasmática e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), de los cuales se conoce que hay cuatro que están codificados en el genoma humano. TIMP-3 inhibe todas las principales metaloproteinasas degradadoras de cartílago, y múltiples líneas de evidencia indican que protege el cartílago. La adición de la proteína a explantes de cartílago previene la degradación inducida por citocina, y la inyección intrarticular reduce el daño de cartílago en el modelo de osteoartritis de desgarramiento de menisco medial de rata.

20 La desregulación de MMPs también ocurre en insuficiencia cardíaca congestiva y se cree que desempeña una función en numerosos procesos proinflamatorios. Sin embargo, se ha impedido el desarrollo de TIMP-3 como inhibidor terapéutico de la actividad de MMP por objeciones en la producción de proteína recombinante y la corta semivida de las formas recombinantes de TIMP-3. En particular, la semivida en suero de TIMP-3 tras la administración intravenosa en ratas es inferior a sesenta minutos, y dicho corto tiempo de residencia afecta negativamente la capacidad para mantener una concentración terapéuticamente útil en un sitio de enfermedad. Por consiguiente, existe una necesidad en la materia de formas de TIMP-3 que presenten producción, purificación y propiedades farmacocinéticas/farmacodinámicas favorables.

25 El documento de patente WO2014/152012 desvela variantes o muteínas de TIMP-3 que comprenden sitios de glucosilación insertados, introducidos por sustitución de ciertos aminoácidos.

El documento de patente WO95/05478 desvela formas glucosiladas y no glucosiladas de TIMP-3 humana.

El documento de patente EP0648838 desvela variantes de TIMP-3 que se han modificado para deleciónar uno o más posibles sitios de glucosilación.

35 Yan Liu et al., *Biotechnology Progress* vol. 25, Nº 5, 2007, páginas 1468-1475, desvelan métodos de introducción de sitios de glucosilación introduciendo sustituciones que producen el motivo N/S-X-T.

Sumario de la invención

40 La invención proporciona polipéptidos TIMP-3 que tienen propiedades ventajosas, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas potenciadas (tales como semivida), niveles mejorados de expresión en comparación con TIMP-3 nativa, afinidad reducida por no dianas (por ejemplo, receptores de secuestrantes), y/o dependencia reducida de heparina para la producción. En una realización, la presente invención proporciona una muteína de TIMP-3 aislada que tiene una región madura que es al menos 90 % idéntica en secuencia de aminoácidos a la región madura de TIMP-3 expuesta en SEQ ID NO: 2 o una muteína de TIMP-3 que tiene una región madura que es al menos 90 % idéntica en secuencia de aminoácidos a los aminoácidos 24-211 de SEQ ID NO: 2, seleccionada del grupo que consiste en:

a) una muteína de TIMP-3 que tiene las mutaciones H78N/Q80T, K94N/E96T, D110N/K112T y R138T, opcionalmente en combinación con una o más de las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en K45N/V47T; K50N/V52T; y P56N/G58T;

b) la muteína de TIMP-3 según a) que comprende además una mutación adicional G173T; y

50 c) la muteína de TIMP-3 según a) o b) que comprende además la mutación F57N.

En algunas realizaciones, se proporciona una muteína de TIMP-3 aislada según la presente invención fusionada con uno o más restos que prolongan la semivida o conjugada con uno o más restos que prolongan la semivida. Por

ejemplo, en algunos aspectos, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende una muteína de TIMP-3 según la presente invención fusionada con el dominio Fc de un anticuerpo aislado en el extremo N o C de TIMP-3. El dominio Fc se puede fusionar mediante el extremo N o C del resto Fc. El dominio Fc puede ser monomérico o heterodimérico. La invención también contempla una muteína de polipéptido de TIMP-3 según la presente invención fusionada con albúmina de suero humano o un anticuerpo completo (en el extremo N o C de la cadena pesada o cadena ligera). En algunos aspectos, la modificación química a la muteína de TIMP-3 según la presente invención para prolongar una semivida incluye la conjugación con polietilenglicol (PEG).

La invención proporciona además una muteína de TIMP-3 que comprende (o que consiste en) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 26, así como un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico aislado) que codifica una muteína de TIMP-3 según una cualquiera de las muteínas de TIMP-3 anteriormente mencionadas según la presente invención. Otros aspectos de la invención son un vector de expresión que comprende el ácido nucleico; una célula hospedadora (por ejemplo, una célula hospedadora aislada) transformada o transfectada con el vector de expresión; y un método de producción de una muteína de TIMP-3 recombinante que comprende cultivar la célula hospedadora transformada o transfectada en condiciones que promuevan la expresión de la muteína de TIMP-3, y recuperar la muteína de TIMP-3.

La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica una muteína de TIMP-3 según la presente invención.

Se proporciona además una composición que comprende la muteína de TIMP-3 según la presente invención, así como un diluyente, excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable.

En otra realización se proporciona una composición según la presente invención para su uso en terapia.

En una realización, la composición según la presente invención es para su uso en el tratamiento de una afección en la que las metaloproteasas de matriz (MMPs) y/u otras proteinasas que se inhiben o son inhibibles por TIMP-3 desempeñan una función causante o agravante, en donde la afección

(a) se selecciona del grupo que consiste en afecciones inflamatorias, osteoartritis, isquemia miocárdica, lesión por reperfusión y progresión a insuficiencia cardíaca congestiva;

(b) se selecciona del grupo que consiste en asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, miocarditis, inflamación relacionada con aterosclerosis y afecciones artríticas;

(c) se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide y artritis psoriásica, miocarditis viral, epidermolísis bullosa distrófica, osteoartritis, pseudogota, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad periodontal, ulceración, cicatrización después de cirugía, reestenosis, enfisema, enfermedad de Paget en el hueso, osteoporosis, esclerodermia, atrofia por compresión de hueso o tejidos como en úlceras de decúbito, colesteatoma, cicatrización anormal, artritis reumatoide pauciarticular, artritis reumatoide poliarticular, artritis reumatoide de aparición sistémica, espondilitis anquilosante, artritis enteropática, artritis reactiva, síndrome SEA (síndrome de seronegatividad, artropatía, artropatía), dermatomiositis, artritis psoriásica, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, miolitis, polimiolitis, dermatomiolitis, osteoartritis, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis, polimialgia reumática, sarcoidosis, esclerosis, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, síndrome de Sjogren, psoriasis, psoriasis en placas, psoriasis guttata, psoriasis inversa, psoriasis pustular, psoriasis eritrodérmica, dermatitis, dermatitis atópica, aterosclerosis, lupus, enfermedad de Still, lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, celiaquía, enteropatía asociada a artropatías seronegativas, colitis microscópica o colagenosa, gastroenteritis eosinofílica, pouchitis resultante después de proctocolectomía y anastomosis ileoanal, pancreatitis, diabetes mellitus dependiente de insulina, mastitis, colecistitis, colangitis, pericolangitis, esclerosis múltiple (EM), asma, asma extrínseca, asma intrínseca, hipersensibilidad de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis crónica, enfisema, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), síndrome disneico, fibrosis quística, hipertensión pulmonar, vasoconstricción pulmonar, lesión pulmonar aguda, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, bronquitis, bronquitis alérgica-bronquiectasia, tuberculosis, alveolitis alérgica, esprúe tropical, asma ocupacional, trastornos de tipo asma, sarcoide, síndrome (o disfunción) por enfermedad reactiva de las vías respiratorias, bisinosis, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinofílico, rinitis, sinusitis y enfermedad parasitaria pulmonar, hipersensibilidad de las vías respiratorias asociada a afecciones inducidas por virus, enfermedad de Guillain-Barre, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, fenómeno de Raynaud, hepatitis autoinmune, enfermedad injerto contra huésped (EICH), isquemia cerebral, lesión cerebral traumática, esclerosis múltiple, neuropatía, miopatía, lesión de la médula espinal y esclerosis lateral amiotrófica (ELA); o

(d) se selecciona del grupo que consiste en estabilización de placas vasculares, vasculopatía, formación de neointima, lesión pulmonar aguda y síndrome disneico agudo.

5 En otras realizaciones, la composición según la presente invención es para su uso en inhibir la degradación de la matriz extracelular cardíaca (MEC) o remodelación cardíaca adversa en un sujeto, en donde la composición se proporciona en una cantidad eficaz para inhibir la degradación de MEC y/o remodelación cardíaca adversa, preferentemente en donde el sujeto ha sufrido un infarto de miocardio.

#### Descripción de las figuras

10 La Figura 1 es una reproducción de un gel de SDS-PAGE que ilustra la cantidad de una proteína de fusión de TIMP-3, N-TIMP-3 (AA 1-144) fusionada con la porción Fc de un anticuerpo ("TIMP-3-Fc"), producida en presencia de cantidades variables de heparina. Los carriles N° 1-4 contuvieron patrones de Fc ("STD"): el carril N° 1 contuvo 100 ng de Fc humano; el carril N° 2 contuvo 250 ng de Fc humano; el carril N° 3 contuvo 500 ng de Fc humano; y el carril N° 4 contuvo 1000 ng de Fc humano. Los carriles N° 5-9 contuvieron 10 µL de muestras de medios de cultivo de células CHOK1 que expresan TIMP-3-Fc cultivadas en ausencia de heparina (carril N° 5), en presencia de 500 mg/L de heparina (carril N° 6), en presencia de 250 mg/L de heparina (carril N° 7), en presencia de 100 mg/L de heparina (carril N° 8), o en presencia de 50 mg/L de heparina (carril N° 9).

15 La Figura 2 es una reproducción de un gel de SDS-PAGE que ilustra la cantidad de una muteína de TIMP-3 fusionada con la porción Fc de un anticuerpo producido en ausencia de heparina. Los carriles N° 1-4 contuvieron patrones de Fc ("STD"): el carril N° 1 contuvo 100 ng de Fc humano; el carril N° 2 contuvo 250 ng de Fc humano; el carril N° 3 contuvo 500 ng de Fc humano; y el carril N° 4 contuvo 1000 ng de Fc humano. El carril N° 5 representó una muestra de células hospedadoras de control. Los carriles N° 6-9 contuvieron 10 µL de muestras de medios de cultivo de células CHOK1 que expresan muteína de TIMP-3-Fc: fusión de TIMP-3 [K45N/V47T/K94N/E96T/D110N/K112T/G173T]-FcG1 (carril N° 6), fusión de TIMP-3 [K45N/V47T/K94N/E96T/D110N/K112T/G173T]-IgG1Fc+EPKSS (carril N° 7), fusión de TIMP-3 [H78N/Q80T/K94N/E96T/D110N/K112T/R138T]-FcG1 (carril N° 8), o fusión TIMP-3 [H78N/Q80T/K94N/E96T/D110N/K112T/R138T]-IgG1Fc+EPKSS (carril N° 9).

20 La Figura 3 es una reproducción de un gel de SDS-PAGE que ilustra la cantidad de una N-TIMP-3 nativa fusionada con albúmina de suero humano (HSA) producida en presencia y ausencia de heparina. Los carriles N° 1-4 contuvieron patrones de Fc ("STD"): el carril N° 1 contuvo 100 ng de Fc humano; el carril N° 2 contuvo 250 ng de Fc humano; el carril N° 3 contuvo 500 ng de Fc humano; y el carril N° 4 contuvo 1000 ng de Fc humano. El carril N° 5 representó una muestra de células hospedadoras de control. Los carriles N° 6-11 contuvieron 10 µL de muestras de diferentes conjuntos de medios de cultivo de TIMP-3-HSA que expresan CHOK1: el Conjunto 1 cultivado con heparina (carril N° 6), el Conjunto 2 cultivado con heparina (carril N° 7), el Conjunto 3 cultivado con heparina (carril N° 8), el Conjunto 1 cultivado sin heparina (carril N° 9), el Conjunto 2 cultivado sin heparina (carril N° 10), el Conjunto 3 cultivado sin heparina (carril N° 11).

25 La Figura 4 es una ilustración de la estructura tridimensional de TIMP-3 asociada a TACE, RAP y LPR-1. Se marcan las lisinas de TIMP-3 en las posiciones 22 y 110. Véase también Wisniewska et al., J. Mol. Biol., 381, 1307-1319 (2008).

30 La Figura 5 contiene dos gráficos de líneas que ilustran propiedades farmacocinéticas de TIMP-3 [K45S, F56N], comparando el área fluorescente/área total (%) o área fluorescente/área total (% de tiempo 0) (eje y) con respecto a los días después del infarto (eje x).

35 La Figura 6 contiene dos gráficos de líneas que ilustran propiedades farmacocinéticas de TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO: 26), comparando el área fluorescente/área total (%) o área fluorescente/área total (% de tiempo 0) (eje y) con respecto a los días después del infarto (eje x).

40 La Figura 7 es un gráfico de líneas que ilustra la fracción expulsada (%) (eje y) observada con el tiempo (día, eje x) después del infarto de miocardio tras la administración de polipéptidos TIMP-3. Triángulo = TIMP-3 de longitud completa (30 mg); cuadrado blanco = dominio de extremo N de TIMP-3 (N-TIMP3) (30 mg); cuadrado negro = N-TIMP3 (30 mg), círculo = control (solución salina).

45 Las Figuras 8A-8C son gráficos de barras que ilustran la función cardíaca mejorada y la remodelación cardíaca reducida mediada por TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO: 26) (denominado "TIMP3v82" en la figura) tras el infarto de miocardio en ratas. La Figura 8A ilustra la fracción expulsada (% de FE, eje y) detectada en el día 3 y día 7 (eje x) tras la administración de sujetos tratados con vehículo (barra a la izquierda) o TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (barra a la derecha). La Figura 8B ilustra el volumen telesistólico (VTS) (eje y) medido en el día 3 y día 7 (eje x) tras la administración de vehículo o TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T]. La Figura 8C ilustra el volumen telediastólico (VTD) (eje y) medido en el día 3 y día 7 (eje x) tras la administración de vehículo o TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T].

La Figura 9 es una ilustración de la estructura tridimensional de TIMP-3 que menciona las posiciones de diversos aminoácidos.

Las Figuras 10A-10C proporcionan secuencias de aminoácidos de las muteínas de TIMP-3. La serie de "X"s incluidas en las secuencias de aminoácidos indica la posición del péptido señal (por ejemplo, los aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO: 2).

#### Descripción detallada de la invención

La invención proporciona composiciones, dichas composiciones para su uso en terapia, y métodos que se refieren a muteínas de TIMP-3 según la presente invención. También se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una muteína de TIMP-3 según la presente invención; plásmidos y vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, y células o líneas celulares que comprenden dichos ácidos nucleicos y/o vectores y plásmidos. Los métodos proporcionados incluyen, por ejemplo, métodos de preparación, o aislamiento de muteínas de TIMP-3 según la presente invención que presentan propiedades deseables.

Existen numerosas afecciones en las que sería ventajoso aumentar TIMP-3 endógena en un mamífero, o aumentar el nivel de TIMP-3 en un tejido particular. Por consiguiente, en el presente documento también se proporcionan métodos de preparación de composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden una muteína de TIMP-3, según la presente invención. En el presente documento también se proporcionan composiciones que comprenden la muteína de TIMP-3 según la presente invención que comprenden un diluyente, excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable para su uso en terapia. Un sujeto puede estar afectado por una afección en la que la desregulación de la actividad de la metaloproteínasa de la matriz da como resultado la remodelación excesiva o inapropiada de tejido.

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados a propósito de la presente invención deben tener los significados que son comúnmente entendidos por los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que se requiera de otro modo por el contexto, los términos en singular deben incluir pluralidades y los términos en plural deben incluir el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas a propósito de, y las técnicas de, cultivo de células y tejido, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son bien conocidas y comúnmente usadas en la materia. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se mencionan y tratan en toda la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante, como comúnmente se realiza en la técnica o como se describe en el presente documento. La terminología usada a propósito de, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritos en el presente documento son los bien conocidos y comúnmente usados en la técnica. Se pueden usar técnicas convencionales para síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

Se debe entender que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

El término "aislado", como se usa para caracterizar una molécula (donde la molécula es, por ejemplo, un polipéptido, un polinucleótido o un anticuerpo) indica que la molécula en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociada a componentes naturalmente asociados que la acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente libre de otras moléculas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza sin intervención humana. Así, una molécula que se sintetiza químicamente, o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente, se "aislará" de sus componentes naturalmente asociados. Una molécula también puede convertirse en sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados por aislamiento, usando técnicas de purificación bien conocidas en la técnica. La pureza u homogeneidad de la molécula se puede ensayar por varios medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la pureza de una muestra de polipéptidos se puede ensayar usando electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción del gel para visualizar el polipéptido usando técnicas bien conocidas en la técnica. Para ciertos fines, se puede proporcionar mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para la purificación. En diversas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido, variante, derivado o muteína de TIMP-3 aislado; un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, variante, derivado o muteína de TIMP-3; y una célula hospedadora aislada que comprende el ácido nucleico o vector de expresión o que produce el polipéptido, variante, derivado o muteína.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se refieren cada uno a una molécula que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Estos términos engloban, por ejemplo, proteínas nativas y artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de polipéptidos (tales como muteínas, variantes y proteínas

de fusión) de una secuencia de proteínas, así como proteínas post-traduccionales, o de otro modo covalentemente, o no covalentemente, modificadas. Un péptido, polipéptido, o proteína puede ser monomérico o polimérico.

El término "fragmento de polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una delección del extremo amino y/o del extremo carboxi en comparación con una proteína correspondiente de longitud completa. Los fragmentos pueden tener, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud. Los fragmentos también pueden tener, por ejemplo, como máximo 1.000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud. Un fragmento puede comprender además, en cualquiera o ambos de sus extremos, uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de una proteína que existe de forma natural diferente (por ejemplo, un dominio Fc o de cremallera de leucina) o una secuencia de aminoácidos artificial (por ejemplo, una secuencia conectora artificial o una proteína de marca).

Una "variante" o "muteína" de un polipéptido (por ejemplo, una variante o muteína de TIMP-3) comprende una secuencia de aminoácidos en donde uno o más restos de aminoácidos se insertan en, delecionan de y/o sustituyen en la secuencia de aminoácidos con respecto a otra secuencia de polipéptidos. Las variantes de la invención incluyen proteínas de fusión. Se entenderá que, a menos que el contexto lo imponga de otro modo, las características de "polipéptidos" o "proteínas" descritas en el presente documento también se atribuyen a variantes, muteínas y derivados.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una que no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia principal (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debe tender a romper una hélice que ocurre en la secuencia principal, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia principal o son necesarias para su funcionalidad). Los ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

Una forma de referir el grado de similitud de una variante o muteína a la proteína nativa es con referencia al porcentaje de identidad entre las dos (o más) secuencias de polipéptidos, o los ácidos nucleicos que codifican secuencias, que se comparan. El "porcentaje de identidad" de dos secuencias de polinucleótidos o dos secuencias de polipéptidos se determina comparando las secuencias usando el programa informático GAP (una parte de GCG Wisconsin Package, versión 10.3 (Accelrys, San Diego, CA)) usando sus parámetros por defecto.

Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido, variante o muteína de TIMP-3) que se ha modificado químicamente, por ejemplo, mediante conjugación con otro resto químico (tal como, por ejemplo, polietilenglicol o albúmina, por ejemplo, albúmina de suero humano), fosforilación y/o glucosilación.

Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos se indican usando las abreviaturas convencionales de una o tres letras. A menos que se indique lo contrario, cada secuencia de polipéptidos tiene un extremo amino a la izquierda y un extremo carboxi a la derecha; cada secuencia de ácidos nucleicos monocatenaria, y en la hebra superior de cada secuencia de ácidos nucleicos bicatenaria, tiene un extremo 5' a la izquierda y un extremo 3' a la derecha. Una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos particular también se puede describir explicando cómo se diferencia de una secuencia de referencia. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos se designan en el presente documento como "n N<sup>o</sup> m" donde "n" designa el aminoácido encontrado en el polipéptido nativo de longitud completa, "N<sup>o</sup>" designa el número de resto de aminoácido y "m" designa el aminoácido que se ha sustituido.

Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en toda la presente memoria e incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos y análogos de nucleótidos que no existen de forma natural), e híbridos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. En una realización, las moléculas de ácidos nucleicos de la invención comprenden un marco de lectura abierto contiguo que codifica una muteína de TIMP-3 de la invención. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las muteínas, variantes o derivados de TIMP-3 descritos en el presente documento se exponen en SEQ ID NO: 27-50 y 61-70. Los nucleótidos 1-69 de SEQ ID NO: 27-50 y 61-70 comprenden la secuencia señal de TIMP. La invención incluye un ácido nucleico que comprende un nucleótido que codifica una muteína de TIMP-3 según la presente invención.

Dos polinucleótidos monocatenarios son "el complemento" entre sí si sus secuencias se pueden alinear en una orientación antiparalela de forma que cada nucleótido en un polinucleótido sea opuesto a su nucleótido complementario en el otro polinucleótido, sin la introducción de huecos, y sin nucleótidos sin aparear en el extremo 5' o 3' de cualquier secuencia. Un polinucleótido es "complementario" a otro polinucleótido si los dos polinucleótidos se pueden hibridar entre sí en condiciones moderadamente rigurosas. Así, un polinucleótido puede ser complementario a otro polinucleótido sin ser su complemento.

Un "vector" es un ácido nucleico que se puede usar para introducir otro ácido nucleico unido a él en una célula. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un molécula de ADN bicatenario lineal o circular en la que se pueden ligar segmentos adicionales de ácidos nucleicos. Otro tipo de vector es un vector viral (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectuosos en la replicación), en donde se pueden introducir segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que comprenden un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y así se replican junto con el genoma hospedador. Un "vector de expresión" es un tipo de vector que puede dirigir la expresión de un polinucleótido elegido.

Una secuencia de nucleótidos está "operativamente unida" a una secuencia reguladora si la secuencia reguladora afecta la expresión (por ejemplo, el nivel, momento preciso o localización de la expresión) de la secuencia de nucleótidos. Una "secuencia reguladora" es un ácido nucleico que afecta la expresión (por ejemplo, el nivel, momento preciso o localización de la expresión) de un ácido nucleico al que se une operativamente. La secuencia reguladora puede, por ejemplo, ejercer sus efectos directamente sobre el ácido nucleico regulado, o mediante la acción de una o varias de otras moléculas (por ejemplo, polipéptidos que se unen a la secuencia reguladora y/o el ácido nucleico). Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Los ejemplos adicionales de secuencias reguladoras se describen en, por ejemplo, Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA y Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06.

Las proteínas extracelulares que existen de forma natural normalmente incluyen una "secuencia señal", que dirige la proteína dentro de la vía celular para la secreción de proteína y que no está presente en la proteína madura. La secuencia señal también se puede denominar un "péptido señal" o "péptido conductor" y se escinde enzimáticamente de la proteína extracelular. La proteína que ha sido así procesada (es decir, que tiene la secuencia señal eliminada) se denominada frecuentemente proteína "madura". Un polinucleótido que codifica una proteína o polipéptido de la invención puede codificar una secuencia señal que existe de forma natural o una secuencia señal heteróloga, numerosas de las cuales se conocen en la técnica.

Como se aprecia por un experto en la técnica, las proteínas o polipéptidos recombinantes según las presentes realizaciones se pueden expresar en líneas celulares, que incluyen líneas celulares de mamífero. Las secuencias que codifican proteínas particulares se pueden usar para la transformación de una célula hospedadora de mamífero adecuada. La transformación puede ser por cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora, que incluye, por ejemplo encapsidar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula hospedadora con el virus (o vector) o por procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica por las patentes de EE.UU. N° 4.399.216; 4.912.040; 4.740.461; y 4.959.455. El procedimiento de transformación usado depende del hospedador a transformar. Se conocen bien en la técnica los métodos de introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en núcleos.

Una "célula hospedadora" es una célula que se puede usar para expresar un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico de la invención. Una célula hospedadora puede ser un procarionta, por ejemplo, *E. coli*, o puede ser un eucariota, por ejemplo, un eucariota unicelular (por ejemplo, una levadura u otro hongo), una célula de planta (por ejemplo, una célula de planta de tabaco o de tomate), una célula de animal (por ejemplo, una célula humana, una célula de mono, una célula de hámster, una célula de rata, una célula de ratón o una célula de insecto) o un hibridoma. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (véase Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados tales como Veggie CHO y líneas celulares relacionadas que crecen en medio sin suero (véase Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31) o cepa DX-B11 de CHO, que es deficiente en DHFR (véase Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) (véase McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821), células renales embrionarias humanas tales como 293, 293 EBNA o MSR 293, células A431 epidérmicas humanas, células Colo205 humanas, otras líneas celulares de primate transformadas, células diploides normales, cepas de células derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HL-60, U937, HaK o Jurkat.

Normalmente, una célula hospedadora es una célula cultivada que se puede transformar o transfectar con un ácido nucleico que codifica polipéptidos, que entonces se puede expresar en la célula hospedadora. En una "transfección transitoria", el ácido nucleico se introduce en la célula hospedadora por uno de varios métodos conocidos en la técnica, y la proteína recombinante se expresa durante un periodo finito de tiempo, normalmente hasta aproximadamente cuatro días, antes de que el ácido nucleico se pierda o degrada, por ejemplo, cuando la célula hospedadora experimenta mitosis. Si se desea una "transfección estable", el ácido nucleico que codifica polipéptidos se puede introducir en la célula hospedadora junto con un ácido nucleico que codifica un marcador de selección. El uso de un marcador de selección permite a un experto en la técnica seleccionar células hospedadoras transfectadas en las que se integra el ácido nucleico que codifica polipéptidos en el genoma de las células hospedadoras de tal

forma que el ácido nucleico que codifica polipéptidos se mantenga mediante mitosis, y se pueda expresar por células de progeñe.

La expresión "célula hospedadora recombinante" se puede usar para indicar una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con un ácido nucleico a expresar. Una célula hospedadora también puede ser una célula que comprende el ácido nucleico pero no lo expresa a un nivel deseado, a menos que una secuencia reguladora se introduzca en la célula hospedadora de forma que se una operativamente con el ácido nucleico. Se entiende que el término célula hospedadora se refiere no solo a la célula objeto particular, sino también a la progeñe o posible progeñe de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a, por ejemplo, mutación o influencia medioambiental, dicha progeñe puede no ser, en realidad, idéntica a la célula parental, pero todavía se incluye dentro del alcance del término como se usa en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "ADN de TIMP-3", "ADN que codifica TIMP-3" y similares indican un ácido nucleico que codifica TIMP-3 seleccionado en el que la TIMP-3 que se expresa del mismo puede ser o bien TIMP-3 nativa o una variante o muteína de TIMP-3 como se describe en el presente documento. Asimismo, "TIMP-3", "proteína TIMP-3" y "polipéptido de TIMP-3" se usan para designar ya sea una proteína TIMP-3 nativa o una proteína TIMP-3 que comprende una o más mutaciones (es decir, un polipéptido, variante, derivado o muteína de TIMP-3). Una muteína de TIMP-3 particular se puede designar por la mutación o mutaciones, por ejemplo, "K45N" o "K45N TIMP-3" o "TIMP-3 K45N" o "polipéptido de TIMP-3 K45N" indica un polipéptido en el que la lisina (K) en el aminoácido 45 de TIMP-3 nativa se ha sustituido con una asparagina (N).

El término "TIMP-3 nativa", como se usa en el presente documento, se refiere a TIMP-3 natural. TIMP-3 se expresa por diversas células o tejidos en un mamífero y está presente en la matriz extracelular; la TIMP-3 que se expresa así también se denomina en el presente documento "TIMP-3" endógena. La secuencia de aminoácidos de TIMP-3, y la secuencia de ácidos nucleicos de un ADN que codifica TIMP-3, se desvelan en la patente de EE.UU. 6.562.596, concedida el 13 de mayo de 2003. El sistema de numeración de aminoácidos usado en la patente de EE.UU. 6.562.596 designa los aminoácidos en el péptido señal (o conductor) con números negativos, y hace referencia a la proteína madura (es decir, la proteína de la que se ha retirado el péptido señal o conductor) como los aminoácidos 1 - 188. Los sistemas de numeración usados en el presente documento se refieren a TIMP-3 con el primer aminoácido del péptido conductor nativo designado N° 1; la TIMP-3 de longitud completa incluye así los aminoácidos 1 - 211, y la forma madura es los aminoácidos 24 - 211. Los expertos habituales en la técnica comprenden fácilmente las diferencias en la numeración de aminoácidos que pueden ocurrir usando estos sistemas de numeración diferentes, y así se puede aplicar fácilmente el sistema de numeración usado en el presente documento a, por ejemplo, un polipéptido de TIMP-3 en el que el primer aminoácido de la forma madura se denomina N° 1. Así, por ejemplo, K45N como se designa en el presente documento se designaría K22N usando el sistema de numeración de la patente de EE.UU. 6.562.596.

TIMP-3 está formada de dos dominios, un dominio del extremo N que comprende los aminoácidos 24 a 143 de TIMP-3 (es decir, aproximadamente dos tercios de la molécula), y el dominio del extremo C, que comprende los aminoácidos 144 a 211. TIMP-3 presenta enlaces disulfuro complejos que facilitan la formación de la estructura secundaria y terciaria TIMP-3. Se ha encontrado que el dominio del extremo N de TIMP-3, frecuentemente denominado "N-TIMP-3", presenta al menos algunas de las actividades biológicas de TIMP-3; por consiguiente, las variantes, derivados y muteínas de TIMP-3 como se describen en el presente documento incluyen variantes, derivados y muteínas de un fragmento de TIMP-3 que comprende el dominio del extremo N.

La proteína TIMP-3 nativa presenta varias dificultades de uso como molécula terapéutica. Por ejemplo, los títulos de expresión en mamífero para la proteína TIMP-3 usando técnicas de expresión en mamífero convencionales son demasiado bajos para permitir que cantidades suficientes de TIMP-3 se produzcan a una escala que es adecuada para una proteína terapéutica. Además, la unión de TIMP-3 a matriz extracelular necesita la inclusión de heparina (o un agente similar que reduce la unión de TIMP-3 a matriz extracelular) en medio de cultivo celular, y la unión a la proteína secuestrante de la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP1) agrava la dificultad de secreción de TIMP-3 recombinante en el medio a un nivel que permite desarrollar un proceso a escala de producción. La producción microbiana en células procariotas de TIMP-3 de longitud completa ha demostrado ser difícil debido al incorrecto plegamiento de la proteína.

Por consiguiente, se han modificado las muteínas de TIMP-3 de la invención para superar una o más de estas dificultades. Los presentes inventores describen en el presente documento polipéptidos que han sido modificados de algún modo y por cualquier motivo, por ejemplo, para: (1) reducir la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a la oxidación, (3) reducir la necesidad de agentes que inhiben la unión de TIMP-3 a matriz extracelular en cultivo celular, (4) alterar las afinidades de unión para otros restos, por ejemplo receptores secuestrantes tales como LRP-1, (5) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales, que incluyen farmacocinética y/o farmacodinámica, o (6) facilitar la expresión y/o purificación de proteína recombinante. Los análogos incluyen muteínas de un polipéptido. Por ejemplo, sustituciones individuales o múltiples de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas) hechas en la secuencia que existe de forma natural (por ejemplo, en la porción del polipéptido fuera del (de los) dominio(s) que forma(n) los contactos intermoleculares). Se pueden usar secuencias consenso para seleccionar restos de aminoácidos para la sustitución; los expertos en la técnica reconocen que también se pueden sustituir restos de aminoácidos adicionales.



En un aspecto, se proporciona una muteína de TIMP-3 según la presente invención que presenta un aumento en los niveles de expresión de la muteína con respecto a los observados con TIMP-3 nativa; en otro aspecto de la invención el aumento de expresión ocurre en un sistema de expresión en células de mamífero. Los niveles de expresión se pueden determinar por cualquier método adecuado que permita un análisis cuantitativo o semicuantitativo de la cantidad de TIMP-3 recombinante (nativa, variante o muteína) en sobrenadante de cultivo celular fluido, es decir, medio acondicionado (CM). En una realización, se evalúan muestras de CM por transferencia Western; en otra realización, se evalúan muestras de CM usando un ELISA convencional de TIMP-3 humana.

En una realización, se observa el aumento en la expresión en un sistema de expresión transitorio; en otra realización, el aumento en la expresión se observa en un sistema de transfección estable. Una realización proporciona una muteína de TIMP-3 según la presente invención para la que el aumento observado en la expresión es dos veces (2x) superior al observado para TIMP-3 nativa; otra realización proporciona una muteína de TIMP-3 según la presente invención para la que el aumento observado en la expresión es cinco veces (5x) superior al observado para TIMP-3 nativa. Las realizaciones adicionales incluyen muteínas de TIMP-3 según la presente invención para las que el aumento en la expresión es tres veces (3x), cuatro veces (4x) o seis veces (6x). En una realización, la expresión de la muteína de TIMP-3 según la presente invención es diez veces (10x) superior a la observada con TIMP-3 nativa; en otra realización, la expresión observada es superior a diez veces, por ejemplo, 20 veces (20x) o mayor, que la observada con TIMP-3 nativa.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan muteínas de TIMP-3 según la presente invención que presentan un requisito reducido para la adición de heparina (u otro agente que inhibe la unión de TIMP-3 a matriz extracelular) a medios de cultivo celular (es decir, independencia de heparina). La reducción en la cantidad de heparina (u otro agente) se puede describir en un modo semicuantitativo, es decir, la reducción puede ser parcial, moderada, sustancial o completa. En otra realización, la reducción se expresa como un porcentaje, por ejemplo, la cantidad de heparina (o agente similar) se puede reducir en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, o más (por ejemplo, en 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %). Los ejemplos de muteínas de TIMP-3 con al menos algún grado de independencia de heparina incluyen, pero no se limitan a, TIMP-3 H78N/Q80T, K94N/E96T, D110N/K112T, R138T (SEQ ID NO: 26) fusionadas con HSA. Se puede producir N-TIMP-3 fusionada con HSA usando niveles reducidos de heparina. En una realización, se proporcionan muteínas de TIMP-3 según la presente invención que comprenden sitios de glucosilación insertados. Como se conoce en la técnica, los patrones de glucosilación pueden depender de tanto la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de restos de aminoácidos de glucosilación particulares, tratados más adelante), como la célula hospedadora u organismo en el que se produce la proteína. Los sistemas de expresión particulares se tratan más adelante. Se pueden determinar la presencia, ausencia, o grado de glucosilación, por cualquier método que sea conocido por un experto en la técnica, que incluye medidas semicualitativas de desplazamientos en el peso molecular (MW) como se observa por transferencia Western o a partir de geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie, mientras que las medidas cuantitativas pueden incluir utilizar técnicas de espectrofotómetro de masas y observación de desplazamientos de MW correspondientes a la adición de glucosilación asociada a asparagina, o mediante observación del desplazamiento de la masa con la retirada de glucosilación asociada a asparagina por una enzima tal como péptido-N-glucosidasa F (PNGasa-F; Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

La glucosilación de polipéptidos normalmente está o bien ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina (N X S) y asparagina-X-treonina (N X T), donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa, a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación a una proteína (por ejemplo, TIMP-3) se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos tal que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también se puede hacer mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia inicial (para sitios de glucosilación ligados a O). Para mayor facilidad, la secuencia de aminoácidos de proteína se altera preferentemente mediante cambios al nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas tal que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Por consiguiente, los sitios de glucosilación asociados a N se pueden añadir alterando un codón para un único aminoácido. Por ejemplo, se pueden alterar los codones que codifican N - X - z (donde z es cualquier aminoácido) para codificar N - X - T (o N - X - S), o se pueden alterar codones que codifican y - X - T/S para codificar N - X - T/S. Alternativamente, se pueden cambiar simultáneamente los codones que codifican dos aminoácidos para introducir un sitio de glucosilación asociado a N (por ejemplo, se pueden alterar los codones y - X - z para codificar N - X - T/S). De este modo, se pueden insertar desde uno hasta doce sitios de glucosilación asociados a N. La inserción de glucosilación también puede ser útil para la mejora de la expresión (véase, por ejemplo, Enhancing the Secretion of Recombinant Proteins by Engineering N-glycosylation Sites. Liu Y. et al, Amer Inst Chem Eng 2009, pg. 1468).

Además de insertar los sitios de glucosilación asociados a N en TIMP-3, se puede modificar cualquier sitio de glucosilación que esté presente en TIMP-3 nativa, por ejemplo, en un esfuerzo por estabilizar la estructura de la molécula. Así, por ejemplo, A en el resto 208 se puede sustituir con un resto diferente, tal como Y, V o G. Las modificaciones adicionales en el sitio 'N - X - T' en los restos 206 - 208 incluyen sustituir F por I en el resto 205, o Y por I en el resto 205, en combinación con una de las sustituciones anteriormente mencionadas en el resto 208.

Así, se puede cribar un subconjunto de sitios expuestos al disolvente desarrollados por análisis computacional para la probabilidad de N-glucosilación. Para métodos que implican la inserción de sitios de glucosilación, es útil una herramienta de predicción de N-glucosilación en la selección de sitios que se pueden mutar para facilitar la posible glucosilación asociada a N, por ejemplo identificando restos que se podrían mutar para formar un sitio de glucosilación N-x-T canónico (donde N es asparagina, x es cualquier aminoácido y T es treonina). Se pueden usar métodos basados en estructura para identificar todos los aminoácidos expuestos al disolvente (incluyendo los aminoácidos con exposición de cadena lateral > 20 Å<sup>2</sup>). Una realización adicional incluye la mutación de lisina que interacciona con LRP1 en TIMP-3, basándose en la estructura cristalina de LRP1/RAP (proteína asociada a receptor) con lisinas RAP interactuantes mapeadas contra TIMP-3.

En el presente documento se contemplan combinaciones adicionales. Por ejemplo, se puede hacer cualquier mutación desvelada en el presente documento en combinación con una mutación en un resto de lisina, en donde el resto de lisina es cualquier lisina en TIMP-3. En una realización, se muta una única lisina adicional; en otra realización, se mutan dos restos de lisina adicionales, tres restos de lisina adicionales, cuatro restos de lisina adicionales o cinco restos de lisina adicionales.

Las mutaciones particulares se muestran en las Figuras 1 y 2 de la solicitud de EE.UU. 14/207.178, presentada el 12 de marzo de 2014, y la solicitud PCT PCT/US2014/026811, presentada el 13 de marzo de 2014. Las figuras presentan un alineamiento de TIMP-3 humana de longitud completa nativa y una forma mutada de TIMP-3 humana de longitud completa en la que la letra "X" se ha sustituido por aminoácidos particulares dentro de la secuencia. La secuencia señal está subrayada; por tanto, se pueden sustituir otras secuencias señal, como se describe en el presente documento.

Se presentan en el presente documento secuencias de aminoácidos de muteínas seleccionadas en el Listado de secuencias. Se proporcionan secuencias de proteínas de longitud completa. En muchos casos, una secuencia señal no está presente en las secuencias expuestas para las diversas muteínas en el listado de secuencias para facilitar un sistema de numeración de restos de aminoácido coherente y el entendimiento de los expertos en la técnica de las designaciones de aminoácidos usadas en el presente documento. La invención incluye las secuencias de muteína expuestas en el presente documento que comprenden además una secuencia señal que es, en diversas realizaciones, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 2 como los aminoácidos 1-23 (es decir, MTPWLGLIVLLGWSLGDWGAEA). SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos representativa de TIMP-3 nativa. Un experto en la técnica apreciará que el péptido señal se retira durante el procesamiento de la proteína para dar como resultado una proteína madura con un extremo N que empieza con el aminoácido cisteína. En diversas realizaciones, la cisteína del extremo N se preserva en la muteína de TIMP-3. Un experto en la técnica también apreciará que entre la expresión de muteína de ADN de TIMP-3 en una célula y el aislamiento de la proteína, ocurre la modificación post-traducciona de la proteína. Los ejemplos específicos de modificaciones post-traduccionales incluyen glucosilación (por ejemplo, glucosilación asociada en N) y retirada del péptido señal; también se contemplan modificaciones adicionales que incluyen fosforilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación, lipidación, proteólisis, y similares.

Se conoce que la secuencia señal de TIMP-3 nativa se puede usar para expresar muteínas de TIMP-3, o se puede sustituir otra secuencia señal. Así, el aminoácido en el resto 1 puede ser M u otro aminoácido; el aminoácido en el resto 2 puede ser T u otro aminoácido, el aminoácido en el resto 3 puede ser P u otro aminoácido, etc., hasta el aminoácido 23. Además, una secuencia señal puede comprender aminoácidos adicionales (es decir, ser más larga que la secuencia señal de TIMP-3 nativa), o puede comprender menos aminoácidos de 23 (es decir, ser más corta que la secuencia señal de TIMP-3 nativa). Independientemente de la longitud de la secuencia señal, los expertos habituales en la técnica serán capaces de utilizar el sistema de numeración en el presente documento para preparar las muteínas de TIMP-3 actualmente desveladas, así como otras muteínas que se podrían preparar.

Se conciben ciertas sustituciones en la forma madura de TIMP-3, y se designan en el presente documento "n N° m" donde "n" designa el aminoácido encontrado en la TIMP-3 de longitud completa nativa, "N°" designa el número de resto de aminoácido y "m" designa el aminoácido que se ha sustituido. Así, por ejemplo, "K45N" indica que la lisina (K) en el aminoácido 45 se ha sustituido con asparagina (N). Las formas mutadas de TIMP-3 humana descritas en el presente documento pueden comprender las siguientes mutaciones (solas, o en combinación): K45N; V47T; K50N; V52T H78N; K94N; E96T; D110N; K112T; R138T; y G173T. Las combinaciones de estas mutaciones también se describen en el presente documento, y pueden incluir desde dos hasta doce (es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12) de las sustituciones ya mencionadas. Por ejemplo, en una realización, la muteína de TIMP-3 según la presente invención comprende (o consiste en) los aminoácidos 24-211 de SEQ ID NO: 2 que tienen las siguientes sustituciones: H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T y R138T.

Las muteínas de TIMP-3 o tienen una secuencia de aminoácidos que es bastante similar a la de TIMP-3 nativa. Como se usa en el presente documento, el porcentaje de identidades se refiere a una comparación de la variante, muteína o derivado de longitud completa maduro con la forma de longitud completa madura de TIMP-3 nativa, es decir, TIMP-3 que carece de un péptido señal (aminoácidos 24 a 211 de TIMP-3). Los expertos en la técnica entenderán fácilmente que se puede hacer una comparación similar entre una variante, muteína o derivado del dominio del extremo N de TIMP-3 y el dominio del extremo N de TIMP-3 nativa.

También se puede expresar la similitud por el número de aminoácidos que se diferencian entre una muteína o variante y una TIMP-3 nativa. Por ejemplo, una variante o muteína de TIMP-3 puede variar de la TIMP-3 nativa por un aminoácido, dos aminoácidos, tres aminoácidos, cuatro aminoácidos, cinco aminoácidos, seis aminoácidos, siete aminoácidos, ocho aminoácidos, nueve aminoácidos, o diez aminoácidos. Una variante o muteína que se diferencia de TIMP-3 nativa en diez aminoácidos será aproximadamente 95 % idéntica a TIMP-3 nativa. En realizaciones adicionales, un variante o muteína de TIMP-3 se diferencia de TIMP-3 madura nativa en 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.

Se pueden hacer cambios adicionales en un ácido nucleico que codifica un polipéptido de TIMP-3 (ya sea nativo, muteína, variante o derivado) para facilitar la expresión. Por ejemplo, se puede sustituir el péptido señal de TIMP-3 nativa con un péptido señal diferente.

Los presentes inventores describen en el presente documento otros derivados de muteínas de TIMP-3 que incluyen conjugados covalentes o agregativos de muteínas de TIMP-3, o sus fragmentos, con otras proteínas o polipéptidos, tales como por expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionadas con el extremo N o extremo C de un polipéptido de TIMP-3. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un péptido señal (o conductor) heterólogo, por ejemplo, el conductor de factor alfa de levadura, o un péptido tal como una marca de epítipo. Los expertos habituales en la técnica entienden que un péptido señal heterólogo se puede diferenciar en longitud del péptido señal de TIMP-3 nativa, pero puede identificar correctamente la localización de muteínas con respecto a la secuencia de aminoácidos de TIMP-3 madura alineando los restos de cisteína del extremo N de polipéptidos de TIMP-3 producidos usando un péptido señal heterólogo.

Las proteínas de fusión que contienen polipéptido de TIMP-3 pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación del polipéptido de TIMP-3 (por ejemplo, poli-His). Otro péptido de marca es el péptido FLAG® descrito en Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988, y la patente de EE.UU. 5.011.912. El péptido FLAG® es altamente antigénico y proporciona un epítipo reversiblemente unido por un anticuerpo monoclonal (mAb) específico, que permite el ensayo rápido y la fácil purificación de proteína recombinante expresada. Están comercialmente disponibles reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en las que el péptido FLAG® se fusiona con un polipéptido dado (Sigma, St. Louis, MO).

En diversas realizaciones, la muteína de TIMP-3 según la presente invención se fusiona con un resto que prolonga la semivida del polipéptido *in vivo*. Los restos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) o un fragmento del mismo (por ejemplo, la porción Fc de un anticuerpo tal como una IgG) o albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano). Alternativamente o además, la muteína de TIMP-3 comprende un dominio de unión a albúmina o ácido graso que se une a albúmina cuando se administra *in vivo*. Un ejemplo de un dominio de unión a albúmina es "albu-tag", un resto derivado de ácido 4-(p-yodofenil)-butanoico (Dumelin et al., *Angew Chem Int Ed Engl* 47:3196-3201 (2008)). El resto se puede fusionar con el extremo N del polipéptido de TIMP-3 o fusionar con el extremo C, y el propio resto puede estar en cualquier orientación (es decir, conectado por el extremo N o C del resto). Opcionalmente, el resto se une al polipéptido de TIMP-3 mediante un conector, tal como un conector peptídico flexible (por ejemplo, un conector que comprende 1-10 o 2-4 glicinas, por ejemplo, cuatro glicinas, o EPKSS (SEQ ID NO: 75)). Los ejemplos de componentes de fusión para las muteínas de TIMP-3 según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, albúmina de suero humano de SEQ ID NO: 71, FcG1 humano de SEQ ID NO: 72, Fc-mono de SEQ ID NO: 73 y Fc humano-mono NdeI5 de SEQ ID NO: 74. La invención contempla proteínas de fusión que comprenden cualquiera de las muteínas según la presente invención fusionadas con cualquiera de los componentes de fusión descritos en el presente documento (por ejemplo, SEQ ID NO: 71-74).

Las modificaciones covalentes también se consideran derivados de las muteínas de TIMP-3 según la presente invención y están incluidas dentro del alcance de la presente invención, y generalmente se hacen, pero no siempre, post-traduccionalmente. Por ejemplo, se introducen en la molécula varios tipos de modificaciones covalentes de la muteína de TIMP-3 haciendo reaccionar restos de aminoácidos específicos de la proteína de unión al antígeno con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o restos del extremo N o C.

Los restos de cisteinilo se hacen reaccionar lo más comúnmente con alfa-haloacetatos (y amins correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos de cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotri-fluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidazolil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil-2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

- Se puede incrementar el número de restos de hidrato de carbono en las muteínas de TIMP-3 de la invención por acoplamiento químico o acoplamiento enzimático de glucósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos en que no requieren la producción de la proteína en una célula hospedadora que tenga capacidades de glucosilación para la glucosilación ligada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, se pueden unir el (los) azúcar(es) a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento de patente WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.
- La retirada de restos de hidrato de carbono presentes en la proteína recombinante de partida se puede llevar a cabo químicamente o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos de los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que queda el polipéptido intacto. La desglucosilación química se describe por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys, 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono en polipéptidos se puede lograr usando una variedad de endo- y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glucosilación en posibles sitios de glucosilación se puede prevenir por el uso del compuesto tunicamicina como se describe por Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glucósido.
- Otro tipo de modificación covalente de la proteína de unión al antígeno comprende enlazar la proteína a diversos polímeros no proteínicos, que incluyen, pero no se limitan a, diversos polioles tales como polietilenglicol (por ejemplo, PEG de aproximadamente 40 kD, 30 kD, 20 kD, 10, kD, 5 kD o 1 kD de tamaño), polipropilenglicol o polioxialquileno, en el modo expuesto en las patentes de EE.UU. Nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. Otros polímeros útiles incluyen, pero no se limitan a, monometoxi-polietilenglicol, dextrano, hidroxietilalmidón, celulosa, poli-(N-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, poliácido siálico (PSA), polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y poli(alcohol vinílico), así como mezclas de cualquiera de los anteriores. En un aspecto, la muteína de TIMP-3 de la invención es un péptido PEGilado. Además, como se conoce en la técnica, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos en diversas posiciones dentro de la proteína para facilitar la adición de dichos polímeros.
- En diversos aspectos, las modificaciones a la secuencia de aminoácidos de TIMP-3 nativa para llegar a la muteína de TIMP-3 de la invención no disminuyen sustancialmente la actividad de TIMP-3 nativa. Por ejemplo, la muteína de TIMP-3 inhibe preferentemente una o más metaloproteinasas de la matriz (por ejemplo, MMP-2, MMP-9 y/o MMP-13), inhibe una o más agregasas (ADAMS) (por ejemplo, ADAMTS4 y/o ADAMTS5), inhibe la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) (TACE), inhibe la producción de TNF-alfa *in vitro* o *in vivo*, inhibe la degradación de matriz extracelular y/o inhibe la inflamación. Se proporcionan en los ejemplos métodos a modo de ejemplo de la caracterización de la actividad de un polipéptido de TIMP-3. Opcionalmente, la muteína de TIMP-3 presenta al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o aproximadamente 100 % de una cualquiera de las actividades asociadas a TIMP-3 nativa, que incluye las actividades expuestas anteriormente. Alternativamente o además, la muteína de TIMP-3 presenta opcionalmente no más de una disminución de 10 veces, no más de una disminución de 5 veces, o no más de una disminución de 2 veces en la actividad (por ejemplo, inhibición de MMP-2 o MMP-9) en comparación con TIMP-3 nativa.

#### *Expresión de polipéptidos de TIMP-3*

- Se puede usar cualquier sistema de expresión conocido en la técnica para preparar los polipéptidos recombinantes de la invención. En general, se transforman células hospedadoras con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica una muteína de TIMP-3 deseada. Entre las células hospedadoras que se pueden emplear están las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Los procariotas incluyen organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen células de insecto y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10) y la línea celular CVI/EBNA derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CVI (ATCC CCL 70) como se describe por McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821. Los vectores de clonación y de expresión apropiados para su uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero se describen por Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985).

- La expresión en células de mamífero puede proporcionar ventajas para la producción de polipéptidos de TIMP-3, para facilitar el plegamiento y la adopción de conformación que se parece mucho a la de TIMP-3 nativa. Se conocen en la técnica numerosos sistemas de expresión en células de mamífero, y/o están comercialmente disponibles; estos últimos incluye sistemas tales como Gibco®Freedom® CHO-S® (un producto diseñado para facilitar el uso con

5 todos los aspectos de clonación y expresión de proteínas recombinantes en cultivo en suspensión derivado de ovario de hámster chino (CHO); ProBioGen, Life Technologies; Carlsbad, CA), GS Gene Expression System™ (un sistema de transfección diseñado para proporcionar el desarrollo de líneas celulares de mamífero compatibles con cGMP estables de alto rendimiento; Lonza Biologics, Slough, RU), tecnología PER.C6® (un paquete de herramientas diseñado para facilitar la producción a gran escala de proteínas recombinantes, utilizando un conjunto continuamente en división de células derivadas de una única célula humana inmortalizada; Crucell, Leiden, Los Países Bajos), o células de amniocito inmortalizadas tales como CAP y CAP-T (sistemas de expresión basados en células humanas para la expresión y producción de proteínas complejas; Cevec, Colonia, Alemania).

10 Los sistemas de expresión en células adicionales incluyen sistemas tales como Selexis SUREtechnology Platform™ (una plataforma de tecnología que se puede aplicar a una variedad de líneas celulares para facilitar el desarrollo de líneas celulares para la producción de proteínas recombinantes; Selexis Inc., Suiza); sistemas de transfección en mamífero ProFection® (un sistema de transfección que proporciona transfecciones en células de alta eficiencia para la producción de proteínas recombinantes; Promega, Madison WI); el sistema de expresión Expi293™ (un sistema de expresión de proteínas transitorias de mamífero de alta densidad, Life Technologies, Grand Island, NY); y los sistemas de transfección transitoria MaxCyte® VLX™ y STX™ (un sistema de transfección escalable para su uso en la producción de proteínas recombinantes, que incluyen los anticuerpos; MaxCyte, Gaithersburg, MD). Los expertos en la técnica conocen además otros sistemas de expresión, tales como las técnicas originalmente descritas por Wigler et al. (Cell 1979:777) y técnicas adicionales que se describen, por ejemplo, por National Research Council of Canada en su sitio web.

20 Se conocen en la técnica diversos recipientes que son adecuados para el cultivo de células transformadas y la producción de proteínas recombinantes. Estos incluyen placas de 24 pocillos profundos, matraces oscilantes de 250 mL y 1 L; y diversos biorreactores de diversos tamaños, por ejemplo, 2 L, 5 L, 10 L, 30 L, 100 L, 1000 L, 10000 L y biorreactores mayores. Se conocen en la técnica otros recipientes adecuados para el cultivo celular y también se pueden usar como se describe en el presente documento.

25 Se conocen bien en la técnica las formulaciones de medios de cultivo celular; normalmente, un medio de cultivo proporciona aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y oligoelementos requeridos por la célula para el crecimiento mínimo y/o supervivencia, así como tampones, y sales. Un medio de cultivo también puede contener componentes complementarios que potencian el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la velocidad mínima, que incluyen, pero no se limitan a, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, y/o glucosa u otra fuente de energía; como se describe en el presente documento, los inhibidores del ciclo celular se pueden añadir a un medio de cultivo. En ciertas realizaciones, un medio se formula ventajosamente hasta pH y concentración de sales óptimo para la supervivencia y proliferación celular. En ciertas realizaciones, el medio es un medio de alimentación que se añade después del comienzo del cultivo celular. En ciertas realizaciones, el medio de cultivo celular es una mezcla de una solución nutritiva inicial y cualquier medio de alimentación que se añade después del comienzo del cultivo celular.

40 Están comercialmente disponibles diversos medios de cultivo de tejido, que incluyen medios de cultivo definidos, por ejemplo, se puede usar uno cualquiera o una combinación de los siguientes medios de cultivo celular: medio RPMI-1640, medio RPMI-1641, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo Eagle, medio F-12K, medio Ham's F12, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio McCoy's 5A, medio Leibovitz's L-15 y medio libre de suero tal como EX-CELL™ serie 300 (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), entre otros. También están disponibles versiones sin suero de dichos medios de cultivo. Los medios de cultivo celular se pueden complementar con concentraciones adicionales o incrementadas de componentes tales como aminoácidos, sales, azúcares, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, tampones, antibióticos, lípidos, oligoelementos y similares, dependiendo de los requisitos de las células a ser cultivadas y/o los parámetros de cultivo celular deseados.

50 Las células transformadas se pueden cultivar en condiciones que promueven la expresión del polipéptido, y el polipéptido se recupera por procedimientos convencionales de purificación de proteínas. Uno de dichos procedimientos de purificación incluye el uso de cromatografía de afinidad, así como otros métodos que se conocen en la técnica. Un método para aislar TIMP-3 original o muteínas de TIMP-3 de sobrenadantes de mamífero es utilizar una TIMP-3 que está fusionada con una marca 6x Histidina del extremo carboxi en combinación con una resina Ni-Sepharose de afinidad por 6x Histidina (por ejemplo, cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC); se conocen en la técnica procedimientos generales, y reactivos, y ejemplos de dichos procedimientos se exponen por QIAGEN, Germantown, MD y GE Healthcare, Pittsburg, PA). Se puede utilizar cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, SP-HP Sepharose®, GE Healthcare) para aislar además TIMP-3 posterior a la elución de IMAC, o como una estrategia alternativa sin el uso de IMAC para capturar TIMP-3 de los sobrenadantes de mamífero (la elución de TIMP-3 y sus muteínas ocurre con el uso de un gradiente de cloruro sódico a pH neutro). La cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, Superdex 200®, GE Healthcare (ejemplo de fase móvil: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM)) es una estrategia general que se puede usar para aislar adicionalmente TIMP-3 o sus muteínas (en combinación con un proceso de IMAC o cromatografía de intercambio iónico. Estos y otros métodos se conocen en la técnica; véase por ejemplo, Protein Purification: Principles: High Resolution Methods, and Applications, Tercera Edición (2012, John Wiley and Sons; Hoboken, NJ).

La cantidad de polipéptido (TIMP-3 nativa o una muteína o variante de TIMP-3) se puede determinar por cualquier método cuantitativo o semicuantitativo adecuado que permita el análisis de la cantidad de TIMP-3 recombinante (nativa, variante o muteína) en fluido de sobrenadante de cultivo celular, es decir, medio acondicionado (CM). Los métodos cuantitativos o semicuantitativos adecuados incluyen transferencia Western y geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie. Las mediciones cuantitativas podrían incluir el uso de un inmunoensayo enzimático tal como un ELISA de TIMP-3 humana (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), o ForteBio Octet® (Pall ForteBio Corp, Menlo Park, CA) con captura mediada por anticuerpo de TIMP-3, o mediciones directas de absorbancia de UV (ultravioleta) (280 nm) en TIMP-3 purificada.

Así, se pueden evaluar los efectos de una mutación particular en TIMP-3 comparando la cantidad de muteína recombinante preparada con la cantidad de proteína nativa preparada en condiciones de cultivo similares. Una muteína o variante de TIMP-3 se puede expresar a niveles que son 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 10x o superiores a los niveles observados para la TIMP-3 nativa. Si se desea, se puede determinar la productividad específica de una línea celular transformada o transfectada particular para permitir la comparación o la productividad específica para diversas formas de TIMP-3. La productividad específica, o qP, se expresa en picogramos de proteína recombinante por célula por día (pg/c/d), y se puede determinar fácilmente aplicando métodos conocidos en la técnica para cuantificar las células en un cultivo y los métodos anteriormente mencionados de cuantificación de proteína recombinante.

#### *Usos de muteínas de TIMP-3*

Se pueden usar muteínas de TIMP-3 según la presente invención, por ejemplo, en ensayos, o se pueden emplear en el tratamiento de cualquier afección en la que se desee un mayor nivel de actividad de TIMP-3 (es decir, afecciones en las que metaloproteasas de matriz (MMPs) y/u otras proteinasas que se inhiben o inhibibles por TIMP-3 desempeñan una función causante o agravante), que incluyen, pero no se limitan a, afecciones inflamatorias, osteoartritis, y otras afecciones en las que ocurre excesiva actividad de MMP o inapropiada (por ejemplo, isquemia miocárdica, lesión por reperfusión, vasculopatía, formación de neointima, y durante la progresión a insuficiencia cardíaca crónica (por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva)). Las afecciones inflamatorias incluyen asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y celiaquía), psoriasis, miocarditis que incluyen miocarditis viral, inflamación relacionada con aterosclerosis, y afecciones artríticas que incluyen artritis reumatoide, artritis psoriásica, y similares.

Las composiciones de muteína de TIMP-3 según la presente invención y descritas en el presente documento modifican la patogénesis y proporcionan una terapia beneficiosa para enfermedades o afecciones caracterizadas por la degradación y/o inflamación de la matriz, es decir, aquellas en las que las metaloproteinasas desempeñan una función perjudicial. Las composiciones se pueden usar solas o conjuntamente con uno o más agentes usados en el tratamiento de dichas afecciones. Por consiguiente, las composiciones de muteína de TIMP-3 según la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de cualquier trastorno donde se provoca la excesiva pérdida de matriz (degradación) por la actividad de metaloproteinasas. Las composiciones de muteína de TIMP-3 según la presente invención son útiles, solas o en combinación, con otros fármacos, en el tratamiento de diversos trastornos asociados a la producción en exceso de colagenasa, gelatinasa, agreganasa, u otra(s) enzima(s) que degradan la matriz o promotoras de inflamación, que incluyen epidermolísis bullosa distrófica, osteoartritis, pseudogota, artritis reumatoide que incluye artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, esclerodermia, enfermedad periodontal, ulceración que incluye ulceración de la córnea, epidérmica o gástrica, cicatrización después de cirugía, y reestenosis. Otras afecciones patológicas en las que la degradación excesiva de colágeno y/o proteoglicano puede desempeñar una función y así donde las composiciones de muteína de TIMP-3 según la presente invención se pueden aplicar incluyen enfisema, enfermedad de Paget en el hueso, osteoporosis, esclerodermia, atrofia por compresión de hueso o tejidos como en úlceras de decúbito, colesteatoma y cicatrización anormal. También se pueden tratar afecciones adicionales que son, directamente o indirectamente, un resultado de las disminuidas cantidades de TIMP-3 o las incrementadas cantidades de metaloproteasas (por ejemplo, en isquemia miocárdica, lesión por reperfusión y durante la progresión a insuficiencia cardíaca congestiva) con las composiciones actualmente descritas, tanto solas como conjuntamente con otros fármacos comúnmente usados para tratar individuos afectados con dichas afecciones. Las composiciones de la presente invención descritas en el presente documento son útiles para la estabilización de placas vasculares y la inhibición de la formación vascular de neointima. Las composiciones de muteína de TIMP-3 según la presente invención se pueden aplicar además como un adyuvante para otros promotores de la cicatrización, por ejemplo, para modular la renovación de colágeno durante el proceso de cicatrización.

Muchas metaloproteinasas también presentan actividad pro-inflamatoria; por consiguiente, las realizaciones adicionales incluyen métodos de tratamiento de inflamación y/o trastornos autoinmunitarios, en donde los trastornos incluyen, pero no se limitan a, inflamación de cartilago y/o degradación de hueso, artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide pauciarticular, artritis reumatoide poliarticular, artritis reumatoide de aparición sistémica, espondilitis anquilosante, artritis enteropática, artritis reactiva, síndrome SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía, artropatía), dermatomiositis, artritis psoriásica, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, miolitis, polimiositis, dermatomiositis, osteoartritis, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis, polimialgia reumática, sarcoidosis, esclerosis, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, síndrome de Sjogren, psoriasis, psoriasis en placas, psoriasis guttata, psoriasis inversa, psoriasis pustular, psoriasis eritrodérmica, dermatitis,

dermatitis atópica, aterosclerosis, lupus, enfermedad de Still, lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, celiaquía, enteropatía asociada a artropatías seronegativas, colitis microscópica o colagenosa, gastroenteritis eosinofílica, o pouchitis resultante después de proctocolectomía y anastomosis ileoanal, pancreatitis, diabetes mellitus dependiente de insulina, mastitis, colecistitis, colangitis, pericolangitis, esclerosis múltiple (EM), asma (incluyendo asma extrínseca e intrínseca, así como afecciones inflamatorias crónicas relacionadas, o hipersensibilidad, de las vías respiratorias), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, es decir, bronquitis crónica, enfisema), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), síndrome disneico, fibrosis quística, hipertensión pulmonar, vasoconstricción pulmonar, lesión pulmonar aguda, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, bronquitis, bronquitis alérgica-bronquiectasia, tuberculosis, alveolitis alérgica, asma ocupacional, trastornos de tipo asma, sarcoide, síndrome (o disfunción) por enfermedad reactiva de las vías respiratorias, bisinosis, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinofílico, rinitis, sinusitis, y enfermedad parasitaria pulmonar, hipersensibilidad de las vías respiratorias asociada a afecciones inducidas por virus (por ejemplo, virus respiratorio sincitial (VRS), virus paragripal (VPG), rinovirus (RV) y adenovirus), enfermedad de Guillain-Barre, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, fenómeno de Raynaud, hepatitis autoinmune, EICH, y similares. Las muteínas de TIMP-3 según la presente invención también tienen aplicación en casos en los que reducidos niveles relativos de TIMP-3 (es decir, una disminución en la relación de TIMP-3 endógena con metaloproteasas, que pueden ser un resultado de reducidas cantidades de TIMP-3 o incrementadas cantidades de metaloproteasas) están asociados con efectos patológicos, por ejemplo, en isquemia miocárdica, lesión por reperfusión, y durante la progresión a insuficiencia cardíaca crónica.

Basándose en la capacidad de TIMP-3 para inhibir la degradación de tejido conjuntivo, las muteínas de TIMP-3 según la presente invención tienen aplicación en casos en los que es útil la inhibición de la angiogénesis, por ejemplo, en la prevención o el retardo del desarrollo tumoral, y la prevención de la invasión de parásitos. Por ejemplo, en el campo de la invasión y metástasis tumoral, el potencial metastásico de algunos tumores particulares se correlaciona con el aumento de la capacidad para sintetizar y secretar colagenasas, y con la incapacidad para sintetizar y secretar cantidades significativas de un inhibidor de metaloproteinasas. Las muteínas de TIMP-3 actualmente desveladas también tienen aplicación terapéutica en inhibir la diseminación de células tumorales durante la extirpación de tumores primarios, durante quimioterapia y radioterapia, durante la recogida de médula ósea contaminada, y durante la derivación de ascitis carcinomatosa. Diagnóticamente, la correlación entre la ausencia de producción de TIMP-3 en un espécimen de tumor y su potencial metastásico es útil como indicador de pronóstico, así como un indicador para posible terapia de prevención.

Las MMPs también actúan sobre la lámina basal y las proteínas de la zónula ocluyente en el cerebro, como parte de la vía para abrir la barrera hematoencefálica (BBB), que facilita la entrada de células y mediadores solubles de inflamación en el cerebro. Por consiguiente, las composiciones según la presente invención son útiles en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso caracterizados por la excesiva permeabilización o permeabilización inapropiada de la BBB. Además, la degradación de proteínas de la matriz alrededor de las neuronas puede dar como resultado pérdida de contacto y muerte celular; así, las composiciones de TIMP-3 según la presente invención pueden proteger las células nerviosas del daño preservando la membrana basal que rodea las células nerviosas. Las composiciones de TIMP-3 inventivas son útiles en el tratamiento o la mejora de la respuesta neuroinflamatoria a lesión, por ejemplo, isquemia cerebral, o para lesión cerebral traumática. Las composiciones según la presente invención desveladas en el presente documento también serán útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas donde la inflamación es una causa subyacente de la enfermedad, por ejemplo, esclerosis múltiple, así como en el tratamiento de diversas formas de neuropatía y/o miopatía, lesión de la médula espinal y esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Por consiguiente, los usos de las composiciones inventivas pueden implicar la co-administración con BDNF, NT-3, ngF, CNTF, NDF, SCF, u otros factores de modulación del crecimiento o proliferación de células nerviosas. Además, las presentes composiciones y métodos se pueden aplicar para fines cosméticos, en los que la inhibición localizada de la rotura de tejido conjuntivo puede alterar el aspecto del tejido.

Los polipéptidos, variantes, muteínas o derivados de TIMP-3 se pueden emplear en un procedimiento *in vitro*, o administrar *in vivo* para aumentar la actividad de TIMP-3 endógena y/o potenciar una actividad biológica inducida por TIMP-3. Las muteínas de TIMP-3 inventivas se pueden emplear *in vivo* en circunstancias en las que TIMP-3 endógena se regula por disminución o se presenta a bajos niveles. Así se pueden tratar los trastornos causados o agravados (directamente o indirectamente) por proteinasas inhibibles por TIMP-3, cuyos ejemplos se proporcionan en el presente documento. En una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende la muteína de TIMP-3 según la presente invención y un diluyente, excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable para su uso en terapia. Los presentes inventores describen en el presente documento un método terapéutico que comprende la administración *in vivo* de una muteína de TIMP-3 según la presente invención a un mamífero en necesidad del mismo en una cantidad eficaz para elevar los niveles de TIMP-3 endógena.

Por ejemplo, la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de una afección en la que MMPs y/u otras proteína que se inhiben o son inhibibles por TIMP-3 desempeñan una función causante o agravante. Los presentes inventores describen en el presente documento un método de tratamiento de un trastorno, tal como uno cualquiera de los trastornos descritos anteriormente, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad de muteína de TIMP-3 para tratar el trastorno. Los presentes inventores describen en el presente documento el uso de la muteína de TIMP-3 según la presente invención en el tratamiento de un trastorno,

tal como uno cualquiera de los trastornos descritos anteriormente, así como el uso de la muteína de TIMP-3 según la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno. Se apreciará que "tratar" y "tratamiento" se refieren a cualquier reducción en la gravedad y/o aparición de síntomas asociados a un trastorno. Cualquier grado de protección, o mejora, de un trastorno o síntoma asociado al mismo es beneficioso para un sujeto, tal como un paciente humano.

Se incluye en la invención una composición para su uso según la presente invención, que inhibe la degradación y/o la remodelación adversa de matriz extracelular cardíaca (MEC), opcionalmente asociada a infarto de miocardio (por ejemplo, infarto agudo de miocardio). La composición se puede administrar a un sujeto en necesidad de la misma en una cantidad terapéuticamente eficaz de muteína de TIMP-3 inhibiendo así la degradación y/o remodelación adversa de MEC. No se requiere la inhibición completa en el contexto de la invención; se contempla cualquier grado de reducción en la degradación y/o remodelación cardíaca adversa de MEC. La homeostasis de MEC se altera en las horas siguientes al infarto, causando inestabilidad y remodelación cardíaca adversa de MEC. La remodelación cardíaca adversa da como resultado cambios estructurales y funcionales en el corazón, tales como adelgazamiento de la pared ventricular, dilatación ventricular izquierda (aumento de VTD VI), disfunción sistólica y diastólica (% de disminución de fracción expulsada (FE)), expansión del infarto y, por último lugar, insuficiencia cardíaca. El mantenimiento de la homeostasis de MEC (completa o en parte) reduce la gravedad del daño tisular y mejora la función cardíaca. Por consiguiente, la composición según la presente invención se puede administrar tan pronto como sea posible después de que se ha determinado que un sujeto está en riesgo de infarto de miocardio (o cualquiera de los trastornos descritos en el presente documento) o tan pronto como sea posible después de que se detecta el infarto de miocardio. Por ejemplo, la muteína de TIMP-3 se administra en el plazo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 o 24 horas desde el infarto de miocardio. Opcionalmente, la administración de la muteína de TIMP-3 da como resultado al menos una mejora de 3 %, al menos 5 %, al menos 10 %, o al menos 15 % en la fracción expulsada (en comparación con FE en un sujeto no administrado con la variante, muteína o derivado de TIMP-3) tras el infarto de miocardio, y/o una mejora en el gasto cardíaco, y/o una reducción en el adelgazamiento de la pared ventricular izquierda, y/o aumento o mantenimiento del volumen telesistólico o volumen telediastólico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona muteínas de TIMP-3 según la presente invención que tienen semivida mejorada *in vivo*. En una realización, la semivida de una muteína de TIMP-3 según la presente invención es al menos dos veces la de la TIMP-3 nativa; en otra realización, la semivida es al menos tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, ocho veces o diez veces superior a la de TIMP-3 nativa. Alternativamente o además, la muteína de TIMP-3 según la presente invención tiene una semivida que es al menos 0,5 horas más larga, al menos 1 hora más larga, al menos 1,5 hora más larga, al menos 2 horas más larga, al menos 3 horas más larga, al menos 6 horas más larga, al menos 8 horas más larga, al menos 10 horas más larga, al menos 12 horas más larga, o al menos 24 horas más larga que TIMP-3 nativa (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos 1-144 de SEQ ID NO: 2). En una realización, la semivida se determina en un mamífero no humano; en otra realización, la semivida se determina en un sujeto humano. En diversas realizaciones, la muteína de TIMP-3 de la presente invención tiene una semivida de al menos dos horas, al menos tres horas, al menos cuatro horas, al menos cinco horas, o más, por ejemplo, hasta 24 horas, hasta 18 horas, hasta 13 horas, o hasta 12 horas. Las realizaciones adicionales proporcionan una muteína de TIMP-3 según la presente invención que tiene una semivida de al menos un día *in vivo* (por ejemplo, cuando se administra a un sujeto humano). En una realización, las muteínas de TIMP-3 según la presente invención tienen una semivida de al menos tres días. En otra realización, las muteínas de TIMP-3 según la presente invención tienen una semivida de cuatro días o más larga o cinco días o más larga. En otra realización, las muteínas de TIMP-3 según la presente invención tienen una semivida de ocho días o más larga. Se puede medir semivida sistémica (por ejemplo, en plasma) o se puede medir semivida *in situ* local (por ejemplo, en tejido cardíaco o tejido adyacente a los sitios de administración local).

En otra realización, la muteína de TIMP-3 se derivatiza o modifica de forma que tenga una semivida más larga en comparación con la proteína de unión a TIMP-3 sin derivatizar o sin modificar. El polipéptido derivatizado puede comprender cualquier molécula o sustancia que confiera una propiedad deseada al polipéptido, tal como incrementada semivida en un uso particular. El polipéptido derivatizado puede comprender, por ejemplo, un resto detectable (o de marcado) (por ejemplo, una molécula radiactiva, colorimétrica, antigénica o enzimática, una perla detectable (tal como una perla magnética o electrodensa (por ejemplo, oro)), o una molécula que se une a otra molécula (por ejemplo, biotina o estreptavidina)), un resto terapéutico o de diagnóstico (por ejemplo, un resto radiactivo, citotóxico o farmacéuticamente activo), o una molécula que aumenta la idoneidad del polipéptido por un uso particular (por ejemplo, administración a un sujeto, tal como un sujeto humano, u otros usos *in vivo* o *in vitro*).

En uno de dichos ejemplos, el polipéptido se derivatiza con un ligando que se une específicamente a tejidos de cartílago articular, por ejemplo como se desvela en el documento de patente WO2008063291 y/o Rothenfluh et al., Nature Materials 7:248 (2008). Los ejemplos de moléculas que se pueden usar para derivatizar un polipéptido incluyen albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano) y polietilenglicol (PEG). Los derivados de polipéptidos unidos a albúmina y PEGilados se pueden preparar usando técnicas bien conocidas en la técnica. En una realización, el polipéptido se conjuga o une de otro modo a transtiretina (TTR) o una variante de TTR. La TTR o variante de TTR se puede modificar químicamente con, por ejemplo, una sustancia química seleccionada del grupo que consiste en dextrano, poli(n-vinilpirrolidona), polietilenglicoles, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxitilados y poli(alcoholes vinílicos) (solicitud de patente de EE.UU. N° 20030195154).



*Composiciones*

La invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de productos de polipéptido (es decir, muteínas de TIMP-3) de la invención junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables útiles en la terapia de TIMP-3 (es decir, condiciones en las que son útiles aumentar los niveles endógenos de TIMP-3 o aumentar la actividad de TIMP-3 endógena). Dichas composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico) y sustancias de carga (por ejemplo, lactosa, manitol); unión covalente de polímeros tales como polietilenglicol a la proteína (como se trata arriba, véase, por ejemplo la patente de EE.UU. 4.179.337); incorporación del material en preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., o en liposomas. Dichas composiciones influirán en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo* de proteínas de unión a TIMP-3. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712.

Generalmente, una cantidad eficaz de los presentes polipéptidos será determinada por la edad, peso y afección o gravedad de la enfermedad del receptor. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences, arriba, en las páginas 697-773. Normalmente, se pueden usar una dosificación de entre aproximadamente 0,001 g/kg de peso corporal y aproximadamente 1 g/kg de peso corporal (o 1 mg-1000 mg), pero se puede usar más o menos, como reconocerá un médico habitual. Para aplicaciones locales (es decir, no sistémicas), tales como aplicaciones tópicas o intrarticulares, la dosis puede ser entre aproximadamente 0,001 g/cm<sup>2</sup> y aproximadamente 1 g/cm<sup>2</sup>. En el contexto de reducir o inhibir la degradación y/o remodelación adversa de tejido cardíaco de MEC, una inyección directa (o serie de inyecciones que constituyen una única administración) en el miocardio comprende opcionalmente 1 mg-50 mg de polipéptido de TIMP-3 (por ejemplo, 3 mg-40 mg, 5 mg-30 mg, o 10 mg-25 mg). La dosis puede ser una o más veces al día, o menos frecuentemente, y puede ser conjuntamente con otras composiciones como se describe en el presente documento. Se puede aplicar una administración de muteína de TIMP-3 una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete días a la semana según se necesite. Alternativamente, la muteína de TIMP-3 se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas (una vez mensualmente). En diversas realizaciones, la pauta de tratamiento comprende una única administración de muteína de TIMP-3; por ejemplo, la intervención tras o durante el infarto de miocardio puede comprender una única administración directamente en el corazón, opcionalmente durante un procedimiento quirúrgico. Se debe observar que la presente invención no se limita a las dosificaciones citadas en el presente documento.

Como es entendido en el campo pertinente, las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de la invención se administran a un sujeto en un modo apropiado para la indicación. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier técnica adecuada, que incluye, pero no se limita a, por vía parenteral, por vía tópica, por vía local o por inhalación. Si se inyecta, la composición farmacéutica se puede administrar, por ejemplo, por vías intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal o subcutánea, por inyección en bolo, o infusión continua.

Se contempla la administración localizada, por ejemplo, en un sitio de enfermedad o lesión, como son administración transdérmica y liberación sostenida de implantes o parches. Otras alternativas incluyen colirios; preparaciones orales que incluyen píldoras, jarabes, pastillas para chupar o chicle; y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, esprays y pomadas. Por ejemplo, la administración localizada a las articulaciones o los sistemas musculoesqueléticos incluye administración periarticular, intrarticular, intrabursal, intracartilaginosa, intrasinovial e intratendinosa. La administración al aparato respiratorio incluye administración intrapulmonar, intrapleural, intrapulmonar, intratraqueal, intrasínusal e intrabronquial, y se puede facilitar, por ejemplo, por un inhalador o un nebulizador. También se contemplan en el presente documento administración intratecal y otros métodos que son útiles para introducir composiciones en el cerebro y/o sistema nervioso, por ejemplo, administración epidural, intradural o peridural, así como administración perineural, intracaudal, intracerebral, intracisternal e intraespinal.

Los ejemplos adicionales de administración local incluyen administración a tejido conjuntamente con cirugía u otro procedimiento médico. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención se puede administrar a tejido cardíaco durante la cirugía que se realiza para tratar o mejorar los síntomas cardíacos, o durante un procedimiento tal como cateterización cardíaca (por ejemplo, intervención coronaria percutánea o angioplastia). La administración puede ser mediante vía intracoronaria, intracárdica, intramiocárdica, epicárdica y/o transendocárdica, por ejemplo, y puede ser guiada por angiografía endocárdica o mapas electromecánicos del área del corazón a inyectar, o usando otras técnicas, tales como imagen por resonancia magnética (IRM). Las composiciones también se pueden administrar mediante inclusión en un parche cardíaco, catéter intracoronario o en el recubrimiento de una prótesis endovascular u otros dispositivo útil en afecciones cardíacas. Un ejemplo de un dispositivo de administración adecuado se describe en la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 62/037.743, presentada el 15 de agosto de 2014.

Además de colirios, también se contempla el uso de pomadas, cremas o geles que administran las presentes composiciones al ojo. La administración directa al interior del ojo se puede llevar a cabo por inyección o administración periocular, conjuntival, intracorneal, subconjuntiva, subtenoniana, retrobulbar, intraocular y/o

intravítrea. Estas y otras técnicas se tratan, por ejemplo, en Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care (2007, American Society of Health-Sytem Pharmacists, Bethesda, MD).

Una pluralidad de agentes actúan en concierto para mantener el equilibrio dinámico de la matriz extracelular y tejidos. En el tratamiento de afecciones donde el equilibrio está inclinado, se pueden usar uno o más de los otros agentes conjuntamente con los presentes polipéptidos. Estos otros agentes se pueden coadministrar o administrar en serie, o una combinación de los mismos. Generalmente, estos otros agentes se pueden seleccionar de la lista que consiste en las metaloproteinasas, serina proteasas, inhibidores de enzimas degradadoras de matriz, enzimas intracelulares, moduladores de la adhesión celular y factores que regulan la expresión de proteinasas reguladoras de la matriz extracelular y sus inhibidores. Aunque a continuación se enumeran ejemplos específicos, un experto en la técnica reconocerá otros agentes que realizan funciones equivalentes, que incluyen agentes adicionales, u otras formas de los agentes enumerados (tales como los producidos sintéticamente, mediante técnicas de ADN recombinante, y análogos y derivados).

También se pueden usar otros inhibidores de la degradación si se desea la prevención incrementada o más específica de la degradación de matriz extracelular. Se pueden seleccionar inhibidores del grupo que consiste en macroglobulina alfa<sub>2</sub>, proteína de la zona del embarazo, ovostatina, inhibidor de alfa<sub>1</sub>-proteína, alfa<sub>2</sub>-antiplasmina, aprotinina, proteasa nexina-1, inhibidor del activador de plasminógeno (PAI)-1, PAI-2, TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-4. Se pueden usar otros, como reconocerá un experto en la técnica.

También se pueden usar enzimas intracelulares conjuntamente con los presentes polipéptidos. Las enzimas intracelulares también pueden afectar la degradación de matriz extracelular, e incluyen enzimas lisosomales, glucosidasas y catepsinas.

También se pueden usar moduladores de la adhesión celular en combinación con los presentes polipéptidos. Por ejemplo, se puede desear modular la adhesión celular a la matriz extracelular antes, durante, o después de la inhibición de la degradación de la matriz extracelular usando los presentes polipéptidos. Las células que han presentado adhesión celular a la matriz extracelular incluyen osteoclastos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos T citolíticos y mastocitos. Los moduladores de la adhesión celular incluyen péptidos que contienen un motivo "RGD" o análogo o antagonistas o agonistas miméticos.

Los factores que regulan la expresión de las proteinasas degradadoras de la matriz extracelular y sus inhibidores incluyen citocinas, tales como IL-1 y TNF-alfa, TGF-beta, glucocorticoides y retinoides. También se puede usar otros factores de crecimiento que efectúan la proliferación y/o diferenciación celular si el efecto deseado es inhibir la degradación de la matriz extracelular usando los presentes polipéptidos, conjuntamente con dichos efectos celulares. Por ejemplo, durante la inflamación, se puede desear el mantenimiento de la matriz extracelular (mediante la inhibición de actividad enzimática), además de desear la producción de neutrófilos; por tanto, se puede administrar G-CSF. Otros factores incluyen eritropoyetina, miembros de la familia de interleucina, SCF, M-CSF, IGF-I, IGF-II, EGF, miembros de la familia de FGF tales como KGF, PDGF, y otros. Se puede desear además actividad de interferones, tales como interferón alfa, beta, gamma, o interferón consenso. Los agentes intracelulares incluyen G-proteínas, proteína cinasa C e inositol fosfatasa. El uso de los presentes polipéptidos puede proporcionar beneficio terapéutico con uno o más agentes implicados en la terapia de inflamación.

También se pueden usar agentes de trans migración celular. Por ejemplo, la inflamación implica la degradación de la matriz extracelular, y el movimiento, o trans migración de células al sitio de lesión. La prevención de la degradación de la matriz extracelular puede prevenir la trans migración celular. Por tanto, se puede desear el uso de los presentes polipéptidos conjuntamente con agonistas o antagonistas de agentes de modulación de la trans migración celular en el tratamiento de inflamación. Los agentes de modulación de la trans migración celular se pueden seleccionar de la lista que consiste en receptores de la superficie de células endoteliales (tales como E-selectinas e integrinas); receptores de la superficie celular de leucocitos (L-selectinas); quimiocinas y quimioatrayentes. Para una revisión de composiciones implicadas en la inflamación, véase Carlos et al., Immunol. Rev. 114: 5-28 (1990).

Además, las composiciones pueden incluir factor de diferenciación neu, "NDF", y los métodos de tratamiento pueden incluir la administración de NDF antes, simultáneamente con, o después de la administración de TIMP-3. Se ha encontrado que NDF estimula la producción de TIMP-2, y la combinación de NDF, TIMP -1, -2 y/o -3 puede proporcionar beneficios en el tratamiento de tumores.

Los polipéptidos de la invención se pueden "marcar" por asociación con una sustancia marcadora detectable (por ejemplo, radiomarcada con <sup>125</sup>I, o marcada con un fluoróforo tal como AlexaFluor® [LifeTechnologies, Grand Island NY]) o colorantes de IR [éster de NHS DyLight 800, Thermo Scientific] para proporcionar reactivos útiles en la detección y cuantificación de TIMP-3 en muestras de tejido sólido y de fluido tales como sangre u orina. También se pueden marcar productos de ácido nucleico de la invención con marcadores detectables (tales como radiomarcas y marcas no isotópicas tales como biotina) y emplear en procesos de hibridación para identificar genes relevantes, por ejemplo.

Como se ha descrito anteriormente, las presentes composiciones de muteína de TIMP-3 tienen una amplia aplicación en una variedad de trastornos. Así, en el presente documento se contempla un kit que incluye las

5 presentes composiciones y opcionalmente una o más de las composiciones adicionales descritas anteriormente para el tratamiento de un trastorno que implica la degradación de matriz extracelular. También se contempla un artículo de fabricación que comprende un material de embalaje y un agente farmacéutico dentro de dicho material de embalaje, en donde dicho agente farmacéutico contiene la(s) presente(s) muteína(s) y en donde dicho material de embalaje comprende una marca que indica un uso terapéutico para TIMP-3. El artículo de fabricación puede comprender la muteína de TIMP-3 en una cantidad deseada (por ejemplo, 1-1000 mg, 1-100 mg, 1-50 mg, o cualquiera de las otras cantidades desveladas en el presente documento). Este artículo de fabricación puede incluir opcionalmente otras composiciones o descripciones de etiqueta de otras composiciones.

### **Ejemplos**

#### **10 *Ejemplo 1:***

Este ejemplo describe un método usado para determinar los efectos, si acaso, de una mutación o mutaciones en TIMP-3 sobre la expresión en un sistema de expresión en mamífero. Este ejemplo describe un sistema general de vector y célula hospedadora, se conocen en la técnica numerosos sistemas de vector y células hospedadoras, se describen en el presente documento, y son adecuados para la determinación de los efectos, si acaso, de mutaciones particulares en una secuencia de TIMP-3 sobre la expresión de proteína recombinante.

15 En general, un ADN que codifica TIMP-3 se liga en un vector de expresión en condiciones convencionales (es decir, la TIMP-3 que codifica ADN está operativamente unida a otras secuencias en el vector tal que sea expresable), y células de mamífero adecuadas se transforman o transfectan con el vector. Las células transformadas o transfectadas se cultivan en condiciones apropiadas, y se expresa la proteína recombinante y se evalúa la cantidad, ya sea cualitativamente/semicuantitativamente, por ejemplo por transferencia Western o SDS-PAGE, o más cuantitativamente usando un ensayo tal como un ELSA (R&D Systems, Minneapolis MN) o ForteBio Octet® (Pall ForteBio Corp, Menlo Park, CA). De este modo, se pueden determinar los efectos de diversas mutaciones sobre la capacidad de células de mamífero para expresar una proteína, muteína o variante de TIMP-3.

25 Si la mutación o mutaciones se hicieron para introducir los sitios de glucosilación asociados a N en un polipéptido de TIMP-3, o para potenciar el sitio de glucosilación nativo, se puede desear evaluar la presencia y/o grado de glucosilación. Las células se transforman o transfectan como se describe previamente y se pueden usar medidas semicuantitativas (por ejemplo, transferencias Western) para determinar si la glucosilación asociada a N no se incorporó satisfactoriamente, se incorporó parcialmente, o se incorporó completamente.

#### ***Ejemplo 2:***

30 Este ejemplo describe un método usado para determinar si una mutación o mutaciones en TIMP-3 produjeron el aumento de la independencia de heparina. Las células se transforman o transfectan y cultivan en presencia o ausencia de heparina. Se puede añadir heparina en cantidades variables, para desarrollar una noción semicuantitativa del grado de dependencia de heparina. Entonces se determinan las cantidades de proteína, muteína o variante de TIMP-3 expresadas en diversas condiciones, y se hace una comparación para determinar si una mutación particular tiene algún efecto sobre si se requiere o no heparina para la liberación de proteína, muteína o variante de TIMP-3 de la matriz extracelular, o si se reduce la cantidad de heparina requerida.

40 Usando el método descrito anteriormente, se determinó la dependencia de heparina de diversas muteínas de TIMP-3. Se transfectaron establemente células CHOK1 (seleccionadas con puromicina) para producir TIMP-3 o muteínas de TIMP-3. Cuando la viabilidad celular alcanzó más de 90 %, las células se sembraron en un medio de producción y se cultivaron en presencia o ausencia de heparina (hasta 500 ug/mL) durante seis días. Se determinaron las cantidades de proteína TIMP-3 mediante SDS-PAGE (4-20 % de Tris-Glicina; Sin reducir + yodoacetamida). Los datos representativos se ilustran en las Figuras 1-3.

45 En ausencia de heparina, no se detectó en medio de cultivo la expresión de una proteína de fusión que comprende un fragmento de TIMP-3 fusionado con un Fc. Figura 1, Carril 5. A medida que aumentó la cantidad de heparina suministrada a los medios de cultivo, aumentó correspondientemente la cantidad de proteína de fusión detectada en los medios de cultivo. Figura 1, Carriles 6-9.

50 La introducción de sitios de glucosilación afectó la dependencia de heparina de las muteínas de TIMP-3. Se produjeron variantes de TIMP-3 [H78N/Q80T/K94N/E96T/D110N/K112T/R138T] y [K45N/V47T/K94N/E96T/D110N/K112T/G173T] fusionada con Fc en células CHOK1 en ausencia de heparina. Se detectó la expresión de las muteínas de TIMP-3 después de seis días de incubación, que indica una dependencia reducida de la heparina. Compárese la Figura 2 con la Figura 1. Se exponen en la Tabla 1 estimaciones de la expresión en mg/mL (Proteína A de ForteBio) .

TABLA 1

Muteína de TIMP-3	Carril	Estimación de expresión
[K45N/V47T/K94N/E96T/ D110N/K112T/G173T]-FcG1	6	95
Fusión de [K45N/V47T/K94N/E96T/ D110N/K112T/G173T]-IgG1Fc+EPKSS	7	89
[H78N/Q80T/K94N/E96T/D110N/K112T/R138T]-FcG1	8	113
Fusión de [H78N/Q80T/K94N/E96T/D110N/K112T/R138T]-IgG1 Fc+EPKSS	9	117

También se afecta la dependencia de heparina por la elección del componente de fusión. A diferencia de la fusión de Fc, la fusión de un fragmento de TIMP-3 nativa (AA 1-144) con albúmina de suero humano (HSA) redujo la dependencia de heparina. La Figura 3 ilustra la robusta expresión de la fusión N-TIMP-3-HSA. Similarmente, la fusión de la variante de TIMP-3 [F57N/K45S] con HSA produjo la fuerte expresión de la proteína en ausencia de heparina, mientras que la fusión con Fc (en lugar de HSA) no abolió la dependencia de heparina.

Este ejemplo demuestra que las muteínas de TIMP-3 descritas en el presente documento presentan dependencia reducida de heparina para la producción en medios de cultivo.

### Ejemplo 3:

Este ejemplo describe los ensayos de inhibición de MMP en los que se mide la actividad de MMP usando métodos fluorimétricos; se conocen en la técnica otros métodos. Por ejemplo, se incrementa la señal de fluorescencia tras la escisión de un sustrato de péptido de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) de MMP extinguida subtipo 5-FAM/QXL 520 por un subtipo de MMP activada o dominio catalítico específico de subtipo. Están disponibles péptidos de FRET para varias MMP diferentes, por ejemplo, de Anaspec (Fremont, CA) o R&D Systems (Minneapolis, MN). Las proteínas de TIMP-3 usadas en el presente documento pueden ser o bien TIMP-3 nativas o muteína, variante o derivado de TIMP-3; las proteínas a probar se denominan moléculas de prueba.

Para el ensayo de actividad de MMP2, se activa pro-MMP2 humana (Anaspec, Fremont, CA) con acetato 4-aminofenilmercúrico 1 mM (APMA, Anaspec, Fremont, CA) durante 1 hora a 37 °C antes de incubar con péptido de FRET sensible a MMP2 5-FAM/QXL 520 en tampón de ensayo proporcionado por el vendedor frente a diversas concentraciones de moléculas de prueba en una Optiplat negra de 384 pocillos (PerkinElmer, Waltham, MA) a 37 °C. Después de 2 horas de incubación, se mide la señal de fluorescencia de la placa de reacción a excitación (490 nm) y emisión (520 nm) en lector de microplacas multimarca EnVision (PerkinElmer, Waltham, MA). Se presentan los datos en unidad relativa de fluorescencia (URF) frente a las concentraciones de molécula de prueba probadas en GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) para estimar la constante de inhibición al 50 % (CI50).

Para la medición de la actividad de MMP9, se incuba un dominio catalítico de MMP9 humana (Anaspec, Fremont, CA) con péptido de FRET 5-FAM/QXL 520 sensible a MMP9 y diversas concentraciones de moléculas de prueba en una Optiplat negra de 384 pocillos (PerkinElmer, Waltham, MA) a 37 °C. Después de 2 horas de incubación, se mide señal de fluorescencia a la excitación (490 nm) y emisión (520 nm) en lector de microplacas multimarca EnVision (PerkinElmer, Waltham, MA). Se presentan los datos en unidad relativa de fluorescencia (URF) frente a las concentraciones de molécula de prueba probadas en GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) para estimar la constante de inhibición al 50 % (CI50).

Para la actividad de MMP13, se valoran moléculas de prueba en tampón de ensayo (Tris 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, ZnCl<sub>2</sub> 10 uM, 0,01 % de Brij 35 (Calbiochem EMD, San Diego, CA), pH 7,5) y se añadieron de nuevo a la placa de ensayo de poliestireno de 96 o 384 pocillos (Griener Bio-One, Alemania). Se diluye MMP13 activa (Calbiochem EMD) en tampón de ensayo y se añade a la valoración de moléculas de prueba y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente en un volumen final de 50 microL. Alternativamente, se activa pro-MMP-13 (R & D Systems, Minneapolis, MN) con APMA durante 2 horas a 37 °C, y se usa en el ensayo. Se prepara un sustrato fluorogénico tal como el sustrato de fluorogénico MMP Mca-PLGL-DpaR-NH2 o el sustrato de péptido fluorogénico de Mca-KPLGL-DpaR-NH2 (R & D Systems), y se añade a la disolución de enzima MMP-13/huTIMP-3/moléculas de prueba. Se mide cinéticamente la actividad de MMP-13, por ejemplo durante 20 minutos usando un lector de placas fluorescentes de Molecular Devices (o equivalente).

Se puede expresar el efecto de las moléculas que se prueban como el porcentaje de inhibición máxima esperada de TIMP-3 de la actividad enzimática de MMP. Alternativamente, puede no ser necesaria una evaluación cuantitativa de la actividad inhibitoria de MMP; más bien, se pueden evaluar moléculas de prueba individuales en cuanto a si inhiben o no MMP. Los expertos habituales en la técnica reconocen que los parámetros expuestos en el presente documento se pueden variar por la aplicación de experimentación rutinaria. Por ejemplo, se realizan experimentos preliminares usando TIMP-3 previamente probada y otros materiales para determinar una concentración apropiada de MMP o pro-MPP. Similarmente, también se pueden determinar el tipo y la concentración apropiada de sustrato.

## ES 2 746 264 T3

Así, por ejemplo, se pueden valorar MMP y comparar con un lote previamente probado de MMP para optimizar los parámetros de ensayo. Además, los expertos habituales en la técnica pueden utilizar ensayos similares para evaluar los efectos, si lo hay, o diversas mutaciones de TIMP-3 sobre la capacidad de una muteína o variante de TIMP-3 para inhibir otras MMPs que incluyen enzima convertidora de TNF alfa (TACE).

### 5 **Ejemplo 4:**

Usando técnicas convencionales de biología molecular, se prepararon ácidos nucleicos que codifican numerosas muteínas de TIMP-3 y se expresaron en células de mamífero, sustancialmente como se describe previamente. Se evaluaron los efectos de las mutaciones sobre la expresión de las muteínas codificadas de TIMP-3. El listado de mutaciones hechas incluye K45N; V47T; K50N; V52T; P56N; F57N; G58T; H78N; Q80T; K94N; E96T; D110N; K112T; R138T; G173T; y sus combinaciones.

Esta tabla resume los resultados de expresión e inhibición de MMP obtenidos con numerosas muteínas de TIMP-3 que se expresaron en células de mamífero. El aumento en el nivel de expresión que demuestra el aumento en veces en la expresión en comparación con el observado para TIMP-3 natural se determina o bien cualitativamente mediante el uso de transferencias Western o geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie, o bien mediante la medición de los títulos de expresión como se mide usando una lectura de ForteBio Octet® usando un anticuerpo anti-TIMP-3 para capturar TIMP-3 (dichos anticuerpos están públicamente disponibles, por ejemplo de EMD Millipore, Billerica, MA: AbCam®, Cambridge, MA:, o R&D Systems, Minneapolis, MN).

TABLA 2

Variante	Nº EG	HI	Título	MMP2	MMP9	TACE
K45N, V47T, P56N, G58T, Q126N, R138T (SEQ ID NO:3)	4	no	+	nd	nd	nd
K45N, V47T, P56N, G58T, K94N, E96T, R138T (SEQ ID NO:4)	4	Sí	++++	1	9	ninguno
K45N, V47T, P56N, G58T, R138T, G173T (SEQ ID NO:5)	4	nd	-	nd	nd	nd
K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T (SEQ ID NO:6)	4	Sí	+++	2	59	ninguno
K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, R138T (SEQ ID NO:7)	4	Sí	+++	2	38	ninguno
K45N, V47T, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO:8)	5	nd	-	nd	nd	nd
K45N, V47T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T (SEQ ID NO:9)	4	nd	-	nd	nd	nd
K45N, V47T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T (SEQ ID NO:10)	4	Sí	+++	2	9	2
K45N, V47T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO:11)	4	no	+	nd	nd	nd
K45S, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T (SEQ ID NO:12)	4	No	+++	3	74	ninguno
K45S, F57N, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T (SEQ ID NO:13)	4	no	+	nd	nd	nd
K50N, V52T P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T (SEQ ID NO:14)	5	Sí	+++	2	19	ninguno
K50N, V52T, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO:15)	5	sí	+	nd	nd	nd
K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T (SEQ ID NO:16)	4	Parcial	+++	3	10	0,6
K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T (SEQ ID NO:17)	5	Parcial	+++	5	21	2
K50N, V52T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO:18)	4	no	+	nd	nd	nd

ES 2 746 264 T3

Variante	Nº EG	HI	Título	MMP2	MMP9	TACE
K50N, V52T, Q126N, R138T, G173T (SEQ ID NO:19)	4	no	+	nd	nd	nd
P56N, G58T, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T (SEQ ID NO:20)	4	Parcial	++++	2	15	ninguno
P56N, G58T K94N, E96T, Q126N, R138T (SEQ ID NO:21)	4	Sí	++++	2	22	ninguno
P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T (SEQ ID NO:22)	4	Sí	++++	2	20	ninguno
P56N, G58T, H78N, Q80T, K94N, E96T, G173T (SEQ ID NO:23)	4	nd	-	nd	nd	nd
P56N, G58T, Q126N, R138T, G173T (SEQ ID NO:24)	4	no	+	nd	nd	nd
H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO:25)	4	nd	-	nd	nd	nd
H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T (SEQ ID NO:26)	4	Sí	+++	2	6	0,4

1: "Nº EG" = número de sitios de glucosilación manipulados  
 2: "HI" indica independencia de heparina, 'Sí', 'No' o 'Parcial' como se describe en el ejemplo  
 3: "Título" se refiere al título relativo en comparación con natural: '+' 1-10 mg/L, '++' 10-25 mg/L, '+++ ' 50-100 mg/L, '++++' >100 mg/L  
 4: "MMP2" enumera el desplazamiento en la actividad inhibitoria de MMP2 (es decir, disminución en veces) en comparación con natural  
 5: "MMP9" enumera el desplazamiento en la actividad inhibitoria de MMP9 (es decir, disminución en veces) en comparación con natural  
 6: "TACE" enumera el desplazamiento en la actividad inhibitoria de TACE (es decir, disminución en veces) en comparación con natural  
 nd = sin datos

5 Se realizaron estudios adicionales para caracterizar proteínas de fusión de la invención usando los métodos descritos en el presente documento. TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO: 26) inhibió MMP2 y MMP9 (CE<sub>50</sub> de 1 nM y 2,5 nM, respectivamente). TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO: 26) fusionado con HSA, Fc e IgG mantuvo la actividad inhibitoria: fusión de HSA, CE<sub>50</sub> de MMP2 = 1,4 nM, CE<sub>50</sub> de MMP9 = 5,1 nM; fusión de Fc, CE<sub>50</sub> de MMP2 = 13,3 nM, CE<sub>50</sub> de MMP9 = 32,9 nM; fusión de IgG, CE<sub>50</sub> de MMP2 = 14 nM, CE<sub>50</sub> de MMP9 = 26 nM. Para comparación, N-TIMP3 presentó CE<sub>50</sub> de MMP2 = 7,6 nM, CE<sub>50</sub> de MMP9 = 1,7 nM. La fusión de HSA con N-TIMP3 produjo CE<sub>50</sub> de MMP2 = 38,7 nM, CE<sub>50</sub> de MMP9 = 36,5 nM, y la fusión de Fc produjo CE<sub>50</sub> de MMP2 = 6,9 nM, CE<sub>50</sub> de MMP9 = 1,6 nM.

10 Se describen muteínas adicionales, que incluyen las mostradas en la Tabla 3 a continuación. En la tabla, se enumeran mutaciones particulares en el encabezado; una "x" debajo de un encabezado particular indica que la mutación está presente. El encabezado "Nº Glu" indica el número de sitios de glucosilación manipulados, y el encabezado "Designación" indica la combinación de mutaciones contempladas. Estas muteínas se pueden preparar y probar como se describe en el presente documento.

15 TABLA 3

K45N, V47T	K50N, V52T	H78N, Q80T	K94N, E96T	D110N, K112T	R138T	G173T	Nº Gluc	Designación
	x			x	x	x	4	K50N/V52T, D110N/K112T, R138T, G173T
x				x	x	x	4	K45N/V47T, D110N/K112T, R138T, G173T

ES 2 746 264 T3

K45N, V47T	K50N, V52T	H78N, Q80T	K94N, E96T	D110N K112T	R138T	G173T	Nº Gluc	Designación
		x		x	x	x	4	H78N/Q80T, D110N/K112T, R138T, G173T
x	x	x			x		4	K45N/V47T, K50N/V52T, H78N/A80T, R138T
x		x		x		x	4	K45N/V47T, H78N/Q80T D110N/K112T, G173T
x		x			x	x	4	K45N/V47T, H78N/Q80T, R138T, G173T
	x	x	x			x	4	K50N/V52T, H78N/Q80T K94N/E96T, G173T
	x	x		x	x		4	K50N/V52T, H78N/Q80T D110N/K112T, R138T
x	x	x		x			4	K45N/V47T, K50N/V52T, H78N/Q80T, D110N/K112T
	x	x			x	x	4	K50N/V52T, H78N/Q80T, R138T, G173T
x		x			x	x	4	K45N/V47T, H78N/Q80T, R138T, G173T
x		x		x	x		4	K45N/V47T, H78N/Q80T, D110N/K112T, R138T
x	x	x		x		x	5	K45N/V47T, K50N/V52T, H78N/Q80T, D110N/K112T,G173T
x	x	x			x	x	5	K45N/V47T, K50N/V52T, H78N/Q80T, R138T,G173T
x	x	x	x			x	5	K45N/V47T, K50N/V52T, H78N/Q80T, K94N/E96T, G173T
x		x	x		x	x	5	K45N/V47T, H78N/Q80T, K94N/E96T, R138T, G173T
	x	x	x		x	x	5	K50N/V52T, H78N/Q80T, K94N/E96T, R138T, G173T
x		x		x	x	x	5	K45N/V47T, H78N/Q80T, D110N/K112T, R138T, G173T
	x	x		x	x	x	5	K50N/V52T, H78N/Q80T, D110N/K112T, R138T, G173T
x	x	x		x	x		5	K45N/V52T, K50N/V52T, H78N/Q80T, D110N/K112T, R138T

**Ejemplo 5:**

Este ejemplo describe un ensayo para evaluar la capacidad de una proteína TIMP-3 para unirse a células HTB-94™ (una línea celular condrocítica disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) por análisis de citometría activada por fluorescencia (FACS). Las células HTB-94™ expresan altos niveles de proteína LRP1 y MEC y son útiles para monitorizar muteína de TIMP-3 que se une a células. Se cultivan células HTB-94 en medio de cultivo HTB-94 (DMEM alto en glucosa que contiene 10 % de suero bovino fetal [FBS] y L-glutamina 2 mM) a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Se siembran las células a una densidad celular de 2,5 x10<sup>4</sup> células/mL en matraces estándar de

5

cultivo de tejido durante 6-12 semanas antes de la tinción y se someten a pases cada 3-4 días después de sacar del matraz mediante tripsinación. Aproximadamente 16 horas antes de la tinción con FACS, se siembran las células HTB-94 a 100.000 células por pocillo sobre placas de cultivo de tejido estándar de 12 pocillos en 2 mL de volumen de medio de HTB94 y se incuban a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células son 80-90 % confluentes antes de la tinción.

- 5 Después de aproximadamente 16 horas, se retira el medio de cultivo de HTB94 de las placas de 12 pocillos por aspiración y se aplica 1 mL de tampón de tinción 4C (solución salina tamponada con fosfato [PBS] 2 % de FBS 0,15 % de NaN<sub>3</sub>) por pocillo. Se incuban las placas de células 1 h sobre hielo. Se aspira el tampón de tinción y se añaden proteínas TIMP-3 marcadas con HIS-Myc (ya sea TIMP-3 nativa o variante de TIMP-3) diluidas en tampón de tinción 80 microg/mL, 0,9 mL/pocillo; se añade el mismo volumen de tampón solo a un pocillo de control negativo.
- 10 Se incuban las placas de células 30 min sobre hielo, se aspiran y se lavan dos veces con 1 mL/pocillo de tampón de tinción. Después de aspirar el segundo tampón de lavado, se añade anticuerpo de ratón anti-pentaHIS conjugado con AlexaFluor488 (Qiagen, Valencia, CA) diluido en tampón de tinción hasta 20 ug/mL, 0,9 mL/pocillo. En paralelo, se añade en paralelo reactivo de tinción de control negativo de anticuerpo mIgG<sub>1</sub> conjugado con AlexaFluor488 irrelevante (eBioscience, San Diego, CA) diluido en tampón de tinción hasta 20 microg/mL a un pocillo duplicado
- 15 teñido con el aglutinante conocido TIMP3 HIS-Myc (por ejemplo, K45S, F57N, SEQ ID NO:23).

- Se incuban placas de células 30 min sobre hielo mientras se protegen de la luz, se aspiran y se lavan dos veces con 1 mL/pocillo de tampón de tinción. Después de aspirar el segundo tampón de lavado, se añade 1 mL por pocillo de tampón de disociación de células (sin enzimas, PBS, catálogo N° 13151-014; Life Technologies, Grand Island NY). Se incuban las placas de células 5 min a 37 °C, y se transfieren las células a tubos de FACS de 4 mL. Se aclaran los pocillos de la placa con 1 mL/pocillo a 25 °C de PBS y se añaden los aclarados a los tubos de FACS correspondientes que contienen las células en tampón de disociación de células. Se centrifugan los tubos 5 min a 1000 RPM para formar un sedimento de células, y se aspiran. Se resuspenden las células en 300 microL de 4 % de paraformaldehído en PBS (PFA) y se pueden almacenar a 4 °C protegidas de la luz hasta que se prueban en FACS.
- 20

- En el plazo de dos días desde la tinción de TIMP3, se adquieren 8000 eventos de células HTB94 fijadas, por ejemplo en un Becton Dickinson FACS Calibur usando FL1 para detectar fluorescencia de AlexaFluor488. Se establece la tensión del detector de dispersión frontal (FSC) a E00, y se establece la tensión del detector de dispersión lateral (SSC) a 316. Usados en combinación, estos detectores miden la luz reflejada de las células como 'dispersión frontal' y 'dispersión lateral', que permite definir la puerta de células HTB-94, también denominado 'regulada', y se separa del material no celular en el tubo basándose en el tamaño y la granularidad de las células. Se establece la tensión del detector de FL1 a 370. Se hace el análisis, por ejemplo, usando FlowJo vX.0.6.
- 25
- 30

- Usando los métodos descritos anteriormente, se determinó que TIMP-3 [K45N, V47T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T] (SEQ ID NO:10) solo se unió débilmente a células HTB-94<sup>TM</sup>, y TIMP-3 [K45S, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO:12), TIMP-3 [K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO:16), TIMP-3 [P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO:22) y TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO:26) no se unieron a células HTB-94<sup>TM</sup>.
- 35

- También se determinó que TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO: 26) no se une a LRP1. La reducida unión a componentes de la matriz extracelular (como se indica por la reducida unión a células HTB-94) y proteínas secuestrantes de LRP-1 simplifica la producción por reducción de la dependencia de heparina, mejora el rendimiento y aumenta la disponibilidad de la molécula *in vivo*, todos los cuales tratan complicaciones en la producción de TIMP-3 y terapia sufridas por los polipéptidos de TIMP-3 anteriores. Así, las muteínas de TIMP-3 descritas en el presente documento proporcionan ventajas únicas con respecto a los polipéptidos de TIMP-3 previamente identificados.
- 40

### **Ejemplo 6:**

- Este ejemplo describe propiedades farmacocinéticas de las muteínas de TIMP-3 descritas en el presente documento.
- 45

- Se anestesiaron ratas Sprague Darley con canulación de la vena yugular (200 g-300 g, Charles River Labs, San Diego, CA) con 5 % de isoflúor antes de la administración con proteínas TIMP-3 (3-6 mg/kg) a través de la vena yugular. Se recogieron muestras de sangre (0,2 mL) en cada punto de tiempo deseado desde 5 minutos hasta 72 horas en tubos de jeringa tratados con EDTA y se centrifugaron para la separación de suero y glóbulos sanguíneos.
- 50 Se analizaron las muestras de suero recogidas por ya fuera inmunoensayos en Gyros (Gyrolabs, Uppsala, Suecia) con anticuerpo monoclonal específico de TIMP-3 (10A7, Amgen) como anticuerpo de captura y anticuerpo anti-penta-histidina (Qiagen, Alameda, CA) o por anticuerpo anti-Fc (Amgen) como anticuerpo de detección. Además, se cuantificó el fragmento específico de TIMP-3 mediante el método de CL-EM/EM. Se incubaron muestras de suero (25 µL) con anticuerpo de captura 10A7 específico de TIMP-3 antes de la digestión con tripsina a 37 °C durante la noche. Se cuantificaron los fragmentos de péptido de distintivo TIMP-3 (WDQLTLSQR y TQYLLTGR) por extrapolación de curvas patrón generadas con los péptidos.
- 55



TABLA 4

Polipéptido de TIMP-3	Eliminación (mL/h/kg)	Semivida (t <sub>1/2</sub> , h)	Vss (mL/kg)
TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T]	48 ± 3	3,8 ± 0,2	134 ± 16
TIMP-3 [K45S, F57N]	189 ± 23	1,1 ± 0,1	71 ± 7
Fusión de TIMP-3 [K45S, F57N]-hetero Fc	45 ± 0	13,6 ± 3,5	208 ± 20

5 La introducción de los sitios de glucosilación asociados a N incrementó la semivida y Vss y redujo la eliminación de muteínas de TIMP-3. TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO: 26) demostró propiedades farmacocinéticas sustancialmente mejoradas en comparación con TIMP-3 [K45S, F57N], que tiene menos sitios de glucosilación asociados a N. La fusión de un resto de prolongación de la semivida (una fusión hetero Fc) con TIMP-3 [K45S, F57N] mejoró sustancialmente las propiedades farmacocinéticas en comparación con TIMP-3 [K45S, F57N] que carece de la porción Fc.

10 También se determinó la semivida sistémica para TIMP-3 [K45N, V47T, P56N, G58T, K94N, E96T, R138T] (SEQ ID NO: 4) (2,7 horas), TIMP-3 [K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T] (SEQ ID NO:17) (2 horas), TIMP-3 [K45N, V47T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T] (SEQ ID NO:10) (1,4 horas) y TIMP-3 [K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO:16) (2 horas) usando métodos similares. Las muteínas de TIMP-3 demostraron semivida incrementada del sistema en comparación con TIMP-3 nativa y el dominio del extremo N de TIMP-3 nativa (ambas 0,8 horas).

15 Se examinó el área bajo la curva (ABC; h\*µg/mL) para TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] y TIMP-3 [K45S, F57N]. Se administró un bolo intravenoso de 3 mg/kg de polipéptido de TIMP-3 a ratas. El ABC para TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] fue 62,5 ± 4,0 en comparación con 16,0 ± 1,9 para TIMP-3 [K45S, F57N]. TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] presentó una mejora en la eliminación y exposición *in vivo* en comparación con TIMP-3 [K45S, F57N].

#### 20 Ejemplo 7:

Este ejemplo describe estudios *in vivo* representativos de polipéptidos de TIMP-3 en modelos animales clínicamente aceptables. Se administraron TIMP-3 y muteínas de TIMP-3 a corazones porcinos o de rata para determinar la semivida y el efecto sobre la función cardíaca.

25 Se aclimataron cerdos Yorkshire maduros (25-30 kg) y se manipularon con procedimientos preoperatorios según el protocolo de IACUC. Se preparó la región que engloba la arteria femoral derecha en un modo estéril y se expuso quirúrgicamente la rama principal de la arteria femoral. Se situó un introductor de catéter (6F Input Introducer Sheath, Medtronic) y se estabilizó en la arteria, y se colocó la funda con un bolo inicial de heparina (4000 unidades, IV) seguido por un bolo adicional cada hora (1000 unidades, IV). Bajo orientación fluoroscópica (GE OEC 9600, UT), se colocó un catéter de angiografía coronaria/Launcher (catéter de guiado 5F Launcher, Medtronic) en los ostia coronarios izquierdos. Se situó un catéter con globo de angioplastia que contiene una luz de inyección (catéter con globo Sprinter OTW de 3 mm x 10 mm, Medtronic) en la porción inferior de la arteria descendente anterior izquierda (LAD). Se ocluyó la LAD por inflado del globo (presión de inflado del globo de 12 ATM, dispositivo de inflado desechable Everest 30, Medtronic) y se mantuvo durante 90 minutos. Cuando se realizó la obtención de imágenes, se infundió lentamente TIMP-3 (5 mg) marcada con colorante IR800 (éster de NHS DyLight 800, Thermo Scientific) a través de la luz del catéter de oclusión con globo a la región miocárdica isquémica justo antes de la reperusión. Entonces se desinfló el globo, y se desacopló y sacó el sistema de catéter. Se ligó la arteria femoral y se cerró la incisión. Se facilitó la analgesia posoperatoria por buprenorfina (0,05 mg/kg, IM) administrada preoperatoriamente, así como un parche de fentanilo (25 ug/h, 72 h) situado preoperatoriamente y tres días posoperatoriamente. Se administró lidocaína adicional (1 mg/kg, IV) y amiodarona (200 mg PO) durante tres días posoperatoriamente, y se administró aspirina (81 mg PO) cada día hasta el procedimiento terminal.

35 Se inyectaron directamente TIMP-3 nativa de longitud completa (F-TIMP3) y el dominio del extremo N de TIMP-3 (AA 1-144, N-TIMP3) en miocardio porcino tras el infarto de miocardio inducido por ligadura. La administración de los polipéptidos mejoró significativamente la función cardíaca; la fracción expulsada mejoró más de 10 % en comparación con la inyección de solución salina dos semanas después del infarto. Véase la Figura 7.

45 Para los procedimientos de obtención de imágenes, en el momento de tiempo diseñado después de I/R (3 h, 1 día, 3 días, 7 días y 14 días), los cerdos se anestesiaron con isoflurano (5 %) y se recogió el VI. Se preparó todo el VI para el análisis. Se sometieron secciones circunferenciales completas de las regiones apical, media (2 secciones) y base a obtención de imágenes de montaje completo para calcular la distribución de TIMP-3 en función del área del VI. Se dispusieron las secciones sobre hielo y se sometieron inmediatamente a obtención de imágenes. Se sometió la sección circunferencial de VI de cada región a obtención de imágenes por epi-iluminación (Xenogen IVIS,

50

PerkinElmer, Inc, MA). Los parámetros para el sistema de obtención de imágenes se basaron en los espectros de IRDye800 (745/800 ex/em), y se recogió la señal durante una ventana de exposición de 0,5 s. Se sometieron las imágenes digitalizadas (Living Imagen Software, PerkinElmer Inc., MA) a planimetría (Imagen J Software, Research Services Branch, MD) para determinar el área de la circunferencia total de VI para esa región. Para la región media de VI, por la cual se hicieron mediciones duplicadas, se calcularon los promedios para ambas. Se expresaron los resultados finales como el área ocupada por IR800-TIMP-3, y se expresaron como un porcentaje del área regional de VI total. Para medidas cuantitativas adicionales de la distribución de TIMP-3, se sometieron secciones de VI (70-100 mg) de cada región y de cada sector a fluorescencia/espectroscopía (Li-Cor Odyssey CLx, Li-Cor Biosciences, NE). También se dispusieron secciones de los órganos recogidos (~100 mg) y muestras de plasma (200 uL) en una microplaca de paredes negras de 96 pocillos sometida a análisis. La siguiente tras la corrección para el ruido de fondo, se normalizó luego la señal espectroscópica de la placa de pocillos de muestra (20 min) a los pesos de muestra absolutos (mg) o volumen de plasma (mL).

TIMP-3 se elimina rápidamente cuando se administra por vía sistémica; la semivida de TIMP-3 cuando se administra por vía intravenosa es inferior a una hora. Usando procedimientos de obtención de imágenes similares a los descritos anteriormente, se determinó que la semivida de TIMP-3 nativa de longitud completa (F-TIMP3) y el dominio del extremo N de TIMP-3 (AA 1-144, N-TIMP3) fue aproximadamente 5 días y 3,4 días, respectivamente, en tejido cardíaco tras la inyección directa después del infarto de miocardio inducido por ligadura. Similarmente, se espera una retención cardíaca más larga de polipéptidos de TIMP-3 tras la administración de catéter intracoronario debido a que TIMP3 tiene alta afinidad de unión hacia proteínas de la matriz extracelular en el miocardio. La semivida de tejido cardíaco de TIMP-3 [K45S, F57N] fue aproximadamente 3 días en el modelo de infarto de miocardio porcino. Véase la Figura 5 ( $t_{1/2} = y = a \cdot e^{-b \cdot x}$ ). La semivida de tejido cardíaco de TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO: 26) fue aproximadamente 5,43 días (es decir, mejoró más de 50 veces más que la administración intravenosa). Véase la Figura 6.

Usando métodos similares a los descritos anteriormente para porcino, se estableció infarto de miocardio en corazones de rata y se administró TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (SEQ ID NO: 26) para observar el impacto sobre la función cardíaca. Se administraron las ratas con vehículo (PBS, n=9) o 4 mg de TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] (n=8) mediante inyección miocárdica. Se midió la fracción expulsada (% de FE) mediante ecocardiografía en el día 3 y día 7 después de la inyección. Los animales administrados con TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] demostraron FE significativamente potenciada en ambos días en comparación con el control (superior a 20 % de aumento en comparación con control). Véase la Figura 8A. El volumen telesistólico (VTS) y el volumen telediastólico (VTD) son indicadores de la remodelación cardíaca; la remodelación ventricular izquierda (VI) después de infarto agudo de miocardio está marcada por un aumento progresivo de VTD y VTS en comparación con el nivel inicial. Como se ilustra en las Figuras 8B y 8C, TIMP-3 [H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T] redujo VTS y VTD en comparación con el control.

Estos resultados descritos anteriormente demuestran que una muteína de TIMP-3 representativa de la invención tiene incrementada semivida en comparación con TIMP-3 nativa, reduce la remodelación cardíaca adversa y mejora la función cardíaca tras el infarto agudo de miocardio.

#### Listado de secuencias

<110> AMGEN INC.

O'Neill, et al.

<120> VARIANTES DE INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASA TIPO TRES (TIMP-3), COMPOSICIONES Y MÉTODOS

45

<130> 01017/49907

<150> 62/042.574

<151> 27-08-2014

50

<160> 75

ES 2 746 264 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 633

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgaggcgt gcacatgctc gcccaaggcc cccaggagc ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggccctt cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacctccaca cgaagcttc cgagagtctc tgtggcctta agctggaggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tcggtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtctctc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcacccgca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccggataaaa gcacatcaa tgccacagac ccc                                     633
    
```

10

<210> 2

<211> 211

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 2

```

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

Gly Asp Trp Gly Ala Glu Ala Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln
                20           25           30

Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly
          35           40           45
    
```

ES 2 746 264 T3

Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile  
 50 55 60

Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln  
 65 70 75 80

Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu  
 85 90 95

Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys  
 100 105 110

Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr  
 115 120 125

Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu Asn Tyr Arg Tyr His Leu Gly Cys Asn  
 130 135 140

Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys  
 145 150 155 160

Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly  
 165 170 175

Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys  
 180 185 190

Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala  
 195 200 205

Thr Asp Pro  
 210

<210> 3  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Asn Val Thr Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Asn Phe Thr Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

10

ES 2 746 264 T3

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Asn Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 4

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Asn Val Thr Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Asn Phe Thr Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

10

ES 2 746 264 T3

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 5

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Asn Val Thr Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Asn Phe Thr Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

10

ES 2 746 264 T3

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 6

<211> 188

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Asn Val Thr Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Pro Asn Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asn Gly Thr Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Arg Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

10

ES 2 746 264 T3

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
180 185

<210> 7

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Asn Val Thr Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
20 25 30

Pro Asn Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
180 185

10



ES 2 746 264 T3

<210> 8

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 8

```

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp
 1                               10                          15

Ile Val Ile Arg Ala Asn Val Thr Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly
 20                          25                          30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg
 35                          40                          45

Gly Phe Thr Lys Met Pro Asn Val Thr Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser
 50                          55                          60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu
 65                          70                          75                          80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn
 85                          90                          95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu
100                          105                          110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr
115                          120                          125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp
130                          135                          140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala
145                          150                          155                          160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala
165                          170                          175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro
180                          185

```

10

<210> 9

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 746 264 T3

<400> 9

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Asn Val Thr Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asn Gly Thr Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

5 <210> 10

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 10

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

ES 2 746 264 T3

Ile Val Ile Arg Ala Asn Val Thr Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asn Gly Thr Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Arg Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 11

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Asn Val Thr Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

10

ES 2 746 264 T3

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 12

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Ser Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Pro Asn Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

10

ES 2 746 264 T3

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asn Gly Thr Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 13

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Ser Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Pro Asn Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro Asn Val Thr Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

10

ES 2 746 264 T3

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 14

<211> 188

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Asn Leu Thr Lys Glu Gly  
 20 25 30

Asn Phe Thr Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asn Gly Thr Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

10

ES 2 746 264 T3

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 15

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Asn Leu Thr Lys Glu Gly  
 20 25 30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro Asn Val Thr Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

10

ES 2 746 264 T3

<210> 16

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 16

```

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp
 1                               10                          15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Asn Leu Thr Lys Glu Gly
 20                          25                          30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg
 35                          40                          45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser
 50                          55                          60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu
 65                          70                          75                          80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asn Gly Thr Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn
 85                          90                          95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu
100                          105                          110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr
115                          120                          125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp
130                          135                          140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala
145                          150                          155                          160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala
165                          170                          175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro
180                          185

```

10

<210> 17

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens



ES 2 746 264 T3

<400> 17

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

5 <210> 18

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 18

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

ES 2 746 264 T3

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Asn Leu Thr Lys Glu Gly  
 20 25 30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 19

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Asn Leu Thr Lys Glu Gly  
 20 25 30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

10

ES 2 746 264 T3

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Asn Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 20

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Asn Phe Thr Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro Asn Val Thr Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

10

ES 2 746 264 T3

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 21

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Asn Phe Thr Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Asn Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

10

ES 2 746 264 T3

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 22

<211> 188

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Asn Phe Thr Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asn Gly Thr Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

10

ES 2 746 264 T3

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

<210> 23

<211> 188

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Asn Phe Thr Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro Asn Val Thr Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Arg Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro  
 180 185

10

ES 2 746 264 T3

<210> 24  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 24

```

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp
 1                               10                          15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly
 20                          25                          30

Asn Phe Thr Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg
 35                          40                          45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser
 50                          55                          60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu
 65                          70                          75                          80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn
 85                          90                          95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Asn Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu
100                          105                          110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr
115                          120                          125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp
130                          135                          140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala
145                          150                          155                          160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala
165                          170                          175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro
180                          185
    
```

10 <210> 25  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 746 264 T3

<400> 25

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

5 <210> 26

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 26

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15  
 Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly



ES 2 746 264 T3

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

<210> 27

<211> 651

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 27

atgacccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc	60
gccgagggct gcacatgctc gcccagccac cccaggagc ccttctgcaa ctccgacatc	120
gtgatccggg ccaatgtgac ggggaagaag ctggtaaagg aggggaactt caccacgctg	180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag	240
tacatccaca cgaagcttc cgagagtctc tgtggcetta agctggaggt caacaagtac	300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc	360
gtggagaggt gggacaatct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac	420

10

ES 2 746 264 T3

ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcggtt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t 651

<210> 28

<211> 651

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 28

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
 gccgaggcgt gcacatgctc gccagccac ccccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc 120  
 gtgatccggg ccaatgtgac ggggaagaag ctggtaaagg aggggaactt caccacgctg 180  
 gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag 240  
 tacatccaca cggagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcgaag ggctgaacta tacgtatcac 420  
 ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcggtt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 10 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t 651

<210> 29

<211> 651

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 29

ES 2 746 264 T3

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
 gccgaggcgt gcacatgctc gccacagccac ccccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc 120  
 gtgatccggg ccaatgtgac ggggaagaag ctggtaaagg aggggaactt caccacgctg 180  
 gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag 240  
 tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta agctggaggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggctg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac 420  
 ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaaggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 ccggataaaa gcatcatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t 651

<210> 30

5

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 30

10

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
 gccgaggcgt gcacatgctc gccacagccac ccccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc 120  
 gtgatccggg ccaatgtgac ggggaagaag ctggtaaagg aggggccccaa cggcacgctg 180  
 gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag 240  
 tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggctg cgtctataat ggcacgatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tcggtatcac 420  
 ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaaggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 ccggataaaa gcatcatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t 651

<210> 31

15

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 746 264 T3

<400> 31

```

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcgt gcacatgctc gccacagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaatgtgac ggggaagaag ctggtaaagg aggggcccaa cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcggtt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcacccgca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccggataaaa gcacatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t      651

```

5 <210> 32

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 32

```

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcgt gcacatgctc gccacagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaatgtgac ggggaagaag ctggtaaagg aggggccctt cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc caatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcacccgca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccggataaaa gcacatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t      651

```

<210> 33

15 <211> 651

<212> ADN

ES 2 746 264 T3

<213> Homo sapiens

<400> 33

```

atgacctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcg gcacatgctc gccagccac cccagggagc ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaatgtgac ggggaagaag ctggtaaagg aggggccctt cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctataat ggacgatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gactccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
5 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t      651

```

<210> 34

<211> 651

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 34

```

atgacctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcg gcacatgctc gccagccac cccagggagc ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaatgtgac ggggaagaag ctggtaaagg aggggccctt cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctataat ggacgatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tcggtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gactccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
15 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t      651

```

<210> 35

ES 2 746 264 T3

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 35

```

atgaccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcg gcacatgctc gccacagccac cccagggagc ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaatgtgac ggggaagaag ctggtaaagg aggggccctt cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggg caacaagtac      300
cagtaacctg tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcaact accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t      651

```

<210> 36

10 <211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 36

15

```

atgaccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcg gcacatgctc gccacagccac cccagggagc ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccagcgtggg ggggaagaag ctggtaaagg aggggcccaa cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggg caacaagtac      300
cagtaacctg tgacaggtcg cgtctataat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t      651

```

ES 2 746 264 T3

<210> 37

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 37

```

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgaggcgt gcacatgctc gcccagccac ccccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccagcgtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggcccaa cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc caatgtgacg      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggctc cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcggtt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcacccgca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccgataaaa gcacatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t      651

```

10

<210> 38

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 38

```

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgaggcgt gcacatgctc gcccagccac ccccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaat ctgacaaagg aggggaactt caccacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300

```

ES 2 746 264 T3

cagtacctgc tgacaggctcg cgtctataat ggcacgatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac 420  
 ctgggttgta actgcaagat caagtctctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 ccggataaaa gcatcatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t 651

<210> 39

<211> 651

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 39

atgacctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
 gccgagggct gcacatgctc gccacagccac cccagggagc ccttctgcaa ctccgacatc 120  
 gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaat ctgacaaaagg aggggccctt cggcacgctg 180  
 gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc caatgtgacg 240  
 tacatccaca cggagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggctcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac 420  
 ctgggttgta actgcaagat caagtctctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 10 ccggataaaa gcatcatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t 651

<210> 40

<211> 651

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 40



ES 2 746 264 T3

atgaccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
 gccgaggcgt gcacatgctc gccagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc 120  
 gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaat ctgacaaagg aggggccctt cggcacgctg 180  
 gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag 240  
 tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggtcg cgtctataat ggcacgatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac 420  
 ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcggtt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaaggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t 651

<210> 41

5

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 41

10

atgaccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
 gccgaggcgt gcacatgctc gccagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc 120  
 gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaat ctgacaaagg aggggccctt cggcacgctg 180  
 gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag 240  
 tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggtcg cgtctataat ggcacgatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac 420  
 ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaaggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t 651

<210> 42

15

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 746 264 T3

<400> 42

```

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcgt gcacatgctc gccacagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaat ctgacaaagg aggggccctt cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccggataaaa gcatcatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t      651

```

5

<210> 43

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 43

```

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcgt gcacatgctc gccacagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaat ctgacaaagg aggggccctt cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta agctggaggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggacaatct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccggataaaa gcatcatcaa tgccacagac ccccaccacc atcaccatca t      651

```

15

<210> 44

<211> 651

<212> ADN

ES 2 746 264 T3

<213> Homo sapiens

<400> 44

```

atgacctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcg gcacatgctc gccagccac cccagggagc ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggaactt caccacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc caatgtgacg      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
5 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t      651

```

<210> 45

<211> 651

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 45

```

atgacctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcg gcacatgctc gccagccac cccagggagc ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggaactt caccacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggacaatct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
15 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t      651

```

<210> 46

ES 2 746 264 T3

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 46

```

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcgt gcacatgctc gccacagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggaactt caccacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtaacctgc tgacaggtcg cgtctataat ggacgatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtctgct tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcggtt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t      651
    
```

<210> 47

10 <211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 47

15

```

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcgt gcacatgctc gccacagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggaactt caccacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc caatgtgcag      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtaacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tcggtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtctgct tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t      651
    
```

ES 2 746 264 T3

<210> 48

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 48

```

atgacctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgaggcgt gcacatgctc gccagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaagggtgt ggggaagaag ctggtaaagg aggggaactt caccacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag      240
tacatccaca cgaagcttc cgagagtctc tgtggcctta agctggaggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggctc cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggacaatct caccctctcc cagcgaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttcta actgcaagat caagtctgc tactacctgc cttgctttgt gactccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcacccgca gaaggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccggataaaa gcacatcaa tgccacagac cccaccacc atcacatca t      651

```

10

<210> 49

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 49

```

atgacctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgaggcgt gcacatgctc gccagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaagggtgt ggggaagaag ctggtaaagg aggggcctt cggcagctg      180

```

ES 2 746 264 T3

gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc caatgtgacg 240  
 tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac 420  
 ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccaccacc atcaccatca t 651

<210> 50

<211> 2391

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 50

atgacccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
 gccgagggct gcacatgctc gcccagccac ccccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc 120  
 gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggcccctt cggcacgctg 180  
 gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc caatgtgacg 240  
 tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggtcg cgtctataat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac 420  
 ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggtt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccgatgcac acaagagtga ggttgcctcat 660  
 cgatttaaag atttgggaga agaaaatttc aaagccttgg tgttgattgc ctttgcctcag 720  
 tatcttcagc agtgtccatt tgaagatcat gtaaaattag tgaatgaagt aactgaattt 780  
 gcaaaaacat gtgttgctga tgagtcagct gaaaattgtg acaaatcact tcataccctt 840  
 tttggagaca aattatgcac agttgcaact cttcgtgaaa cctatggtga aatggctgac 900  
 tgctgtgcaa aacaagaacc tgagagaaat gaatgcttct tgcaacacaa agatgacaac 960  
 ccaaacctcc cccgattggt gagaccagag gttgatgtga tgtgactgc ttttcatgac 1020  
 aatgaagaga catttttgaa aaaatactta tatgaaattg ccagaagaca tccttacttt 1080  
 tatgccccgg aactcctttt ctttgctaaa aggtataaag ctgcttttac agaatggtgc 1140  
 caagctgctg ataaagctgc ctgcctgttg ccaagctcg atgaacttcg ggatgaaggg 1200

10

ES 2 746 264 T3

```

aaggcttcgt ctgccaaaca gagactcaag tgtgccagtc tccaaaaatt tggagaaaga      1260
gctttcaaag catgggcagt agctcgctg agccagagat ttcccaaagc tgagtttgca      1320
gaagtttcca agttagtgac agatcttacc aaagtccaca cggaatgctg ccatggagat      1380
ctgcttgaat gtgctgatga cagggcggac cttgccaaagt atatctgtga aatcaagat      1440
tcgatctcca gtaaactgaa ggaatgctgt gaaaaacctc tgttgaaaa atcccactgc      1500
attgccgaag tggaaaatga tgagatgctt gctgacttgc cttcattagc tgctgatttt      1560
gttgaaagta aggatgtttg caaaaactat gctgaggcaa aggatgtctt cctgggcatg      1620
tttttgatg aatatgcaag aaggcatcct gattactctg tcgtgctgct gctgagactt      1680
gccaaagacat atgaaaccac tctagagaag tgctgtgccg ctgcagatcc tcatgaatgc      1740
tatgccaaag tgttcgatga atttaaactt cttgtggaag agcctcagaa tttaatcaaa      1800
caaaattgtg agctttttga gcagcttga gagtacaat tccagaatgc gctattagtt      1860
cgttacacca agaaagtacc ccaactgtca actccaactc ttatcgaggt ctcaagaaac      1920
ctagaaaaag tgggcagcaa atggtgtaa catcctgaag caaaaagaat gccctgtgca      1980
gaagactatc tatccgtggt cctgaaccag ttatgtgtgt tgcatagaa aacgccagta      2040
agtgacagag tcaccaaag ctgcacagaa tccttggtga acaggcgacc atgcttttca      2100
gctctggaag tcgatgaaac atacgttccc aaagagttta cagctaacac attcaccttc      2160
catgcagata tatgcacact ttctgagaag gagagacaaa tcaagaaaca aactgtgctt      2220
gttgagctcg tgaaacacaa gcccaaggca acaaagagc aactgaaagc tgccatggat      2280
gatttcgag cttttgtaga gaagtgtgct aaggctgacg ataaggagac ctgcttttagc      2340
gaggagggta aaaaacttgt tgcggccagt caggccgct taggcttatg a              2391

```

<210> 51

<211> 773

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

```

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp
 1           5           10           15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly
          20           25           30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg
          35           40           45

Gly Phe Thr Lys Met Pro Asn Val Thr Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser
 10           50           55           60

```

10

ES 2 746 264 T3

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asn Gly Thr Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95  
 Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110  
 Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125  
 Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140  
 Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175  
 Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro Asp Ala His Lys  
 180 185 190  
 Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys  
 195 200 205  
 Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe  
 210 215 220  
 Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr  
 225 230 235 240  
 Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr  
 245 250 255  
 Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr  
 260 265 270  
 Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu  
 275 280 285  
 Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val  
 290 295 300  
 Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu  
 305 310 315 320



ES 2 746 264 T3

Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr  
 325 330 335

Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala  
 340 345 350

Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro  
 355 360 365

Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln  
 370 375 380

Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys  
 385 390 395 400

Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe  
 405 410 415

Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu  
 420 425 430

Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu  
 435 440 445

Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys  
 450 455 460

Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu  
 465 470 475 480

Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp  
 485 490 495

Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp  
 500 505 510

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

Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr  
 530 535 540

Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys  
 545 550 555 560

Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile

ES 2 746 264 T3

565 570 575

Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln  
580 585 590

Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Leu Ser Thr  
595 600 605

Pro Thr Leu Ile Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys  
610 615 620

Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr  
625 630 635 640

Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro  
645 650 655

Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg  
660 665 670

Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys  
675 680 685

Glu Phe Thr Ala Asn Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu  
690 695 700

Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Val Leu Val Glu Leu  
705 710 715 720

Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Ala Met  
725 730 735

Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys  
740 745 750

Glu Thr Cys Phe Ser Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln  
755 760 765

Ala Ala Leu Gly Leu  
770

<210> 52

<211> 419

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

10 Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp



ES 2 746 264 T3

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 260 265 270

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 275 280 285

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 290 295 300

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 305 310 315 320

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 325 330 335

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 340 345 350

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 355 360 365

Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 370 375 380

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 385 390 395 400

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 405 410 415

Pro Gly Lys

<210> 53

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45

10

ES 2 746 264 T3

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val  
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly Lys  
 225

<210> 54

<211> 640

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Asn Leu Thr Lys Glu Gly  
 20 25 30

10

ES 2 746 264 T3

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro Gln Val Gln Leu  
 180 185 190

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

Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Asp Tyr Phe Trp  
 210 215 220

Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His  
 225 230 235 240

Ile His Asn Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg  
 245 250 255

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu Arg Leu  
 260 265 270

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp  
 275 280 285

ES 2 746 264 T3

Arg Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
 290 295 300

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 305 310 315 320

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 325 330 335

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 340 345 350

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 355 360 365

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 370 375 380

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 385 390 395 400

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 405 410 415

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 420 425 430

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 435 440 445

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 450 455 460

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 465 470 475 480

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 485 490 495

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 500 505 510

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 515 520 525

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 530 535 540

ES 2 746 264 T3

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
545 550 555 560

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
565 570 575

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
580 585 590

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
595 600 605

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
610 615 620

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
625 630 635 640

<210> 55

<211> 403

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Asn Leu Thr Lys Glu Gly  
20 25 30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
100 105 110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
115 120 125

10



ES 2 746 264 T3

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Thr Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro Glu Ile Val Leu  
 180 185 190

Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr  
 195 200 205

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ser Glu Leu Ala Trp  
 210 215 220

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile Tyr Gly Ala  
 225 230 235 240

Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
 245 250 255

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe  
 260 265 270

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly  
 275 280 285

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val  
 290 295 300

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser  
 305 310 315 320

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln  
 325 330 335

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val  
 340 345 350

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu  
 355 360 365

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu  
 370 375 380

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg  
 385 390 395 400

Gly Glu Cys

ES 2 746 264 T3

<210> 56

<211> 405

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 56

```

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp
 1                               10                      15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly
 20                      25                      30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg
 35                      40                      45

Gly Phe Thr Lys Met Pro Asn Val Thr Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser
 50                      55                      60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Asn Leu Thr Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu
 65                      70                      75                      80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asn Gly Thr Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn
 85                      90                      95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu
100                      105                      110

Asn Tyr Thr Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr
115                      120                      125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp
130                      135                      140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala
145                      150                      155                      160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala
165                      170                      175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro Ala Pro Glu Leu

```



ES 2 746 264 T3

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15  
 Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30  
 Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45  
 Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60  
 Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95  
 Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110  
 Asn Tyr Arg Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125  
 Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140  
 Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175  
 Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro Asp Ala His Lys  
 180 185 190  
 Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys  
 195 200 205  
 Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe  
 210 215 220  
 Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr  
 225 230 235 240

ES 2 746 264 T3

Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr  
 245 250 255  
 Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr  
 260 265 270  
 Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu  
 275 280 285  
 Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val  
 290 295 300  
 Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu  
 305 310 315 320  
 Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr  
 325 330 335  
 Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala  
 340 345 350  
 Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro  
 355 360 365  
 Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln  
 370 375 380  
 Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys  
 385 390 395 400  
 Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe  
 405 410 415  
 Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu  
 420 425 430  
 Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu  
 435 440 445  
 Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys  
 450 455 460  
 Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu  
 465 470 475 480  
 Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp  
 485 490 495

ES 2 746 264 T3

Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp  
 500 505 510

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

Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr  
 530 535 540

Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys  
 545 550 555 560

Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile  
 565 570 575

Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln  
 580 585 590

Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr  
 595 600 605

Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys  
 610 615 620

Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr  
 625 630 635 640

Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro  
 645 650 655

Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg  
 660 665 670

Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys  
 675 680 685

Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu  
 690 695 700

Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu  
 705 710 715 720

Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met  
 725 730 735

Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys  
 740 745 750

Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln  
 755 760 765

Ala Ala Leu Gly Leu His His His His His His  
 770 775

ES 2 746 264 T3

<211> 777

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 58

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
 1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Ser Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
 20 25 30

Pro Asn Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
 50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
 85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
 100 105 110

Asn Tyr Arg Tyr His Leu Gly Cys Asn Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp  
 130 135 140

Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala  
 145 150 155 160

Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala  
 165 170 175

Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala Thr Asp Pro Gly Gly Gly Gly  
 180 185 190

ES 2 746 264 T3

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu  
 195 200 205  
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln  
 210 215 220  
 Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys  
 245 250 255  
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu  
 260 265 270  
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro  
 275 280 285  
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu  
 290 295 300  
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His  
 305 310 315 320  
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg  
 325 330 335  
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg  
 340 345 350  
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala  
 355 360 365  
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser  
 370 375 380  
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu  
 385 390 395 400  
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro  
 405 410 415  
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys  
 420 425 430  
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp





ES 2 746 264 T3

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
690 695 700

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
705 710 715 720

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
725 730 735

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
740 745 750

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val  
755 760 765

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
770 775

<210> 59

<211> 718

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
20 25 30

Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
100 105 110

Asn Tyr Arg Tyr His Leu Gly Cys Asn Gly Gly Gly Gly Asp Ala His  
115 120 125

10

ES 2 746 264 T3

Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe  
130 135 140

Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro  
145 150 155 160

Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys  
165 170 175

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

Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr  
195 200 205

Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn  
210 215 220

Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu  
225 230 235 240

Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu  
245 250 255

Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro  
260 265 270

Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala  
275 280 285

Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu  
290 295 300

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

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

Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu  
340 345 350

Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr  
355 360 365

Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp  
370 375 380

ES 2 746 264 T3

Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu  
 385 390 395 400

Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala  
 405 410 415

Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala  
 420 425 430

Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys  
 435 440 445

Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro  
 450 455 460

Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr  
 465 470 475 480

Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala  
 485 490 495

Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu  
 500 505 510

Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe  
 515 520 525

Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser  
 530 535 540

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

Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp  
 565 570 575

Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr  
 580 585 590

Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn  
 595 600 605

Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro  
 610 615 620

Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr  
 625 630 635 640

ES 2 746 264 T3

Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu  
645 650 655

Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val  
660 665 670

Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp  
675 680 685

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

Gln Ala Ala Leu Gly Leu Val Asp His His His His His His  
705 710 715

<210> 60

<211> 718

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp  
1 5 10 15

Ile Val Ile Arg Ala Ser Val Val Gly Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly  
20 25 30

Pro Asn Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg  
35 40 45

Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser  
50 55 60

Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu  
65 70 75 80

Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn  
85 90 95

Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu  
100 105 110

Asn Tyr Arg Tyr His Leu Gly Cys Asn Gly Gly Gly Gly Asp Ala His  
115 120 125

Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe  
130 135 140

10

ES 2 746 264 T3

Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys  
 165 170 175  
 Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His  
 180 185 190  
 Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr  
 195 200 205  
 Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn  
 210 215 220  
 Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu  
 225 230 235 240  
 Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu  
 245 250 255  
 Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro  
 260 265 270  
 Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala  
 275 280 285  
 Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu  
 290 295 300  
 Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys  
 305 310 315 320  
 Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe  
 325 330 335  
 Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu  
 340 345 350  
 Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr  
 355 360 365  
 Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp  
 370 375 380  
 Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu



ES 2 746 264 T3

Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu  
645 650 655

Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val  
660 665 670

Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp  
675 680 685

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

Gln Ala Ala Leu Gly Leu Val Asp His His His His His His  
705 710 715

<210> 61

<211> 2391

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 61

```

atgaccacctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc      60
gccgagggcgt gcacatgctc gcccagccac ccccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc      120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggccctt cggcacgctg      180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc caatgtgacg      240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac      300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctataat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc      360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac      420
ctgggttgta actgcaagat caagtctctc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag      480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggt accctggcta ccagtccaaa      540
cactacgcct gcatccggca gaaggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc      600
ccggataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccgatgcac acaagagtga ggttgctcat      660
cgatttaaag atttgggaga agaaaatttc aaagccttgg tgttgattgc ctttgetcag      720
tatcttcagc agtgtccatt tgaagatcat gtaaaattag tgaatgaagt aactgaattt      780
gcaaaaacat gtgttgctga tgagtcagct gaaaattgtg acaaatcact tcataacctt      840
tttggagaca aattatgcac agttgcaact cttcgtgaaa cctatggtga aatggctgac      900
tgctgtgcaa aacaagaacc tgagagaaat gaatgcttct tgcaacacaa agatgacaac      960
ccaaacctcc ccgattggt gagaccagag gttgatgtga tgtgactgc ttttcatgac      1020
aatgaagaga catttttgaa aaaatactta tatgaaattg ccagaagaca tcctactttt      1080
tatgccccgg aactcctttt ctttgctaaa aggtataaag ctgcttttac agaattgtgc      1140

```

10



ES 2 746 264 T3

caagctgctg ataaagctgc ctgcctggtg ccaaagctcg atgaacttcg ggatgaaggg 1200  
aaggcttcgt ctgccaaaca gagactcaag tgtgccagtc tccaaaaatt tggagaaaga 1260  
gctttcaaag catgggcagt agctcgctg agccagagat ttcccaaagc tgagtttgca 1320  
gaagtttcca agttagtgac agatcttacc aaagtccaca cggaatgctg ccatggagat 1380  
ctgcttgaat gtgctgatga cagggcggac cttgccaaagt atatctgtga aatcaagat 1440  
tcgatctcca gtaaactgaa ggaatgctgt gaaaaacctc tgttgaaaa atcccactgc 1500  
attgccgaag tggaaaatga tgagatgcct gctgacttgc cttcattagc tgctgatttt 1560  
gttgaaagta aggatgtttg caaaaactat gctgaggcaa aggatgtctt cctgggcatg 1620  
tttttgtatg aatatgcaag aaggcatcct gattactctg tcgtgctgct gctgagactt 1680  
gccaaagacat atgaaaccac tctagagaag tgctgtgccg ctgcagatcc tcatgaatgc 1740  
tatgccaaag tgttcgatga atttaaacct cttgtggaag agcctcagaa tttaatcaaa 1800  
caaaattgtg agctttttga gcagcttggg gagtacaat tccagaatgc gctattagtt 1860  
cgttacacca agaaagtacc ccaactgtca actccaactc ttatcgaggt ctcaagaaac 1920  
ctaggaaaag tgggcagcaa atgttgtaaa catcctgaag caaaaagaat gccctgtgca 1980  
gaagactatc tatccgtggt cctgaaccag ttatgtgtgt tgcatgagaa aacgccagta 2040  
agtacagag tcaccaaag ctgcacagaa tccttggtga acaggcgacc atgcttttca 2100  
gctctggaag tcgatgaaac atacgttccc aaagagttta cagctaacac attcaccttc 2160  
catgcagata tatgcacact ttctgagaag gagagacaaa tcaagaaaca aactgtgctt 2220  
gttgagctcg tgaaacacaa gcccaaggca acaaaagagc aactgaaagc tgccatggat 2280  
gatttgcag cttttgtaga gaagtgtgc aaggctgacg ataaggagac ctgctttagc 2340  
gaggagggta aaaaacttgt tgcggccagt caggccgct taggcttatg a 2391

<210> 62

<211> 1326

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 62

atgaccocctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
gccgaggcgt gcacatgctc gccagccac cccagagacg cttctgcaa ctccgacatc 120  
gtgatccggg ccagtgtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggcccaa tggcacgctg 180  
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag 240  
tacatccata cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta agctggaggt caacaagtac 300  
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tcggtatcac 420

10

ES 2 746 264 T3

ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgtctctc aatttcggtt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaaggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 ccggataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccggtggag gtggagacaa aactcacaca 660  
 tgtccccctg gccacgacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt cttccccca 720  
 aaacccaagg acaccctcat gatctccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 780  
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840  
 aatgccaaga caaagccgag agaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900  
 ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960  
 aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaagggca gccccgagaa 1020  
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatccgg aaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080  
 acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140  
 cagccggaga acaactacaa gaccacgct cccgtgctga agtccgacgg ctcttcttc 1200  
 ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260  
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320  
 ggtaaa 1326

<210> 63

<211> 741

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 63

atggggtcaa ccgccatcct cggcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgcctgac 60  
 aaaactcaca catgtccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 120  
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 180  
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtc cgtggacggc 240  
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 300  
 gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 360  
 aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 420  
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 480  
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg 540  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac gacaccagc ctcccgtgct ggactccgac 600  
 ggctccttct tctctatag cgacctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 660  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacagca gaagagcctc 720

10

ES 2 746 264 T3

tcctgtctc cgggtaaata a

741

<210> 64

<211> 1989

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 64

atgacccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc	60
gccgaggcgt gcacatgctc gccacgccac ccccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc	120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaat ctgacaaagg aggggccctt cggcacgctg	180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag	240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac	300
cagtacctgc tgacaggctc cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc	360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcgaagg ggctgaacta tacgtatcac	420
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag	480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa	540
cactacgcct gcacccgga gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggccctt	600
ccgataaaa gcacatcaa tgccacagac ccccaggctc agctgcagga gtccggccca	660
ggactggtga agccttcaca gaccctgtcc ctcaacctgca ctgtctctgg tggctccatc	720
agcagtgggtg attactcttg gagctggatc cggcagctcc caggggaagg cctggagtgg	780
attgggcaca tccataacag tgggaccacc tactacaatc cgtccctcaa gactcgagtt	840
accatatacag tagacacgtc taagaagcag ttctccctga ggctgagttc tgtgactgcc	900
gcggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaga gatcaggggg gtgactacgc ttatggtatg	960
gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcc	1020
gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc	1080
ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc	1140
agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag gactctactc cctcagcagc	1200
gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac	1260
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca aatcttgtga caaaactcac	1320
acatgccac cgtgccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagctt cctcttcccc	1380
ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg	1440
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg	1500
cataatgcc aagacaaagc gggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	1560
gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	1620

10

ES 2 746 264 T3

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1680  
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1740  
 ctgacctgcc tgggtcaaag cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1800  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1860  
 ttctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1920  
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1980  
 ccgggtaaa 1989

<210> 65

<211> 1278

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 65

atgacccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
 gccgaggcgt gcacatgctc gccacgccac ccccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc 120  
 gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaat ctgacaaagg aggggccctt cggcacgctg 180  
 gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag 240  
 tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tacgtatcac 420  
 ctgggttcta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcactt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggccctt 600  
 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccgaaattg tgttgacgca gtctccaggc 660  
 accctgtctt tgtctccagg ggaaagagcc accctctcct gcagggccag tcagggattt 720  
 agtagaagcg aattagcctg gtaccagcag aaacctggcc aggctcccag cctcctcatc 780  
 tatggtgcat ccagcagggc cactggcctc ccagacaggt tcagtggcag tgggtctggg 840  
 acagacttca ctctaccat cagcagactg gagcctgaag attttgagcgt gtattactgt 900  
 caacaatttg gtagttcacc gtggacgttc ggccaagggc ccaaggtgga aatcaaacga 960  
 actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 1020  
 actgctagcg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 1080  
 aagtggtgata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 1140  
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 1200  
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 1260

10

ES 2 746 264 T3

ttcaacaggg gagagtgt

1278

<210> 66

<211> 1284

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 66

atgaccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc	60
gccgaggcgt gcacatgctc gccacagccac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc	120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggccctt cggcacgctg	180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc caatgtgacg	240
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta atctgacggt caacaagtac	300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctataat ggcacgatgt acacggggct gtgcaacttc	360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcgaag ggctgaacta tacgtatcac	420
ctgggttgta actgcaagat caagtctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag	480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcggtt accctggcta ccagtccaaa	540
cactacgcct gcatccgca gaaggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc	600
ccggataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccgcacctg aactcctggg gggaccgtca	660
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc	720
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	780
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	840
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	900
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaagcc	960
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgacc accctgcccc catcccggga ggagatgaac	1020
aagaccaggt tcagcctgac ctgcctggtc aaaggettct atcccagcga catcgcctg	1080
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacgaca ccacgcctcc cgtgctggac	1140
tccgacggct ccttcttct ctatagcgac ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag	1200
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccaeta cacgcagaag	1260
agcctctccc tgtctccggg taag	1284

10

<210> 67

<211> 2409

<212> ADN

15

<213> Homo sapiens

ES 2 746 264 T3

<400> 67

atgacccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc	60
gccgaggcgt gcacatgctc gccagccac cccagagc ccttctgcaa ctccgacatc	120
gtgatccggg ccaaggtggt ggggaagaag ctggtaaag aggggccctt cggcacgctg	180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag	240
tacatccata cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta agctggaggt caacaagtac	300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc	360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaag ggctgaacta tcggtatcac	420
ctgggttgta actgcaagat caagtctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag	480
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggt accctggcta ccagtccaaa	540
cactacgctt gcatccgca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc	600
ccggataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccgatgcac acaagagtga ggttgctcat	660
cggtttaaag atttgggaga agaaaatttc aaagccttg tggtgattgc ctttgctcag	720
tatcttcagc agtgtccatt tgaagatcat gtaaaattag tgaatgaagt aactgaattt	780
gcaaaaacat gtgttgctga tgagtcagct gaaaattgtg acaaatcact tcataccctt	840
tttgagaca aattatgcac agttgcaact cttcgtgaaa cctatgggta aatggctgac	900
tgctgtgcaa aacaagaacc tgagagaaat gaatgcttct tgcaacacaa agatgacaac	960
ccaaacctcc ccgattggt gagaccagag gttgatgtga tgtgactgc ttttcatgac	1020
aatgaagaga catttttgaa aaaatactta tatgaaattg ccagaagaca tccttacttt	1080
tatgccccgg aactcctttt ctttgctaaa aggtataaag ctgcttttac agaatgttg	1140
caagctgctg ataaagctgc ctgcctgtg ccaaagctcg atgaacttcg ggatgaaggg	1200
aaggcttcgt ctgccaaaaca gagactcaag tgtgccagtc tccaaaaatt tggagaaaga	1260
gctttcaaa catgggcagt agctcgctg agccagagat ttcccaaagc tgagtttgca	1320
gaagtttcca agttagtgc agatcttacc aaagtccaca cggaatgctg ccatggagat	1380
ctgcttgaat gtgctgatga cagggcggac cttgccaaat atatctgtga aaatcaagat	1440
tcgatctcca gtaaactgaa ggaatgctgt gaaaaacctc tgttgaaaa atcccactgc	1500
attgccgaag tggaaaatga tgagatgcct gctgacttgc cttcattagc tgctgatttt	1560
gttgaaagta aggatgtttg caaaaactat gctgaggcaa aggatgtctt cctgggcatg	1620
ttttgtatg aatatgcaag aaggcacct gattactctg tcgtgctgct gctgagactt	1680
gccaagacat atgaaaccac tctagagaag tgctgtgccc ctgcagatcc tcatgaatgc	1740
tatgccaaag tgttcgatga atttaaacct cttgtggaag agcctcagaa tttaatcaaa	1800
caaaattgtg agctttttga gcagcttga gactacaaat tccagaatgc gctattagtt	1860
cgttacacca agaaagtacc ccaagtgtca actccaactc ttgtagaggt ctcaagaaac	1920
ctaggaaaag tgggcagcaa atggtgtaa catcctgaag caaaaagaat gccctgtgca	1980

ES 2 746 264 T3

gaagactatc tatccgtggt cctgaaccag ttatgtgtgt tgcattgagaa aacgccagta 2040  
 agtgacagag tcaccaaagt ctgcacagaa tccttggtga acaggcgacc atgcttttca 2100  
 gctctggaag tcgatgaaac atacgttccc aaagagtta atgctgaaac attcaccttc 2160  
 catgcagata tatgcacact ttctgagaag gagagacaaa tcaagaaaca aactgcactt 2220  
 gttgagctcg tgaaacacaa gcccaaggca acaaagagc aactgaaagc tgttatggat 2280  
 gatttcgag cttttgtaga gaagtgtgc aaggctgacg ataaggagac ctgctttgcc 2340  
 gaggaggta aaaaacttgt tgctgcaagt caagctgcct taggcttaca tcatcatcat 2400  
 catcattga 2409

<210> 68

<211> 2400

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 68

atgacccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
 gccgaggcgt gcacatgctc gccacagcac cccagggacg ccttctgcaa ctccgacatc 120  
 gtgatccggg ccagtgtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggcccaa tggcacgctg 180  
 gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag 240  
 tacatccata cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta agctggaggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcgaagg ggctgaaacta tcggtatcac 420  
 ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaag 480  
 aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcgggt accctggcta ccagtccaaa 540  
 cactacgcct gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
 ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac cccggtggag gtggagatgc acacaagagt 660  
 gaggttgctc atcggtttaa agatttggga gaagaaaatt tcaaagcctt ggtgttgatt 720  
 gcctttgctc agtatcttca gcagtgtcca tttgaagatc atgtaaaatt agtgaatgaa 780  
 gtaactgaat ttgcaaaaac atgtgttgct gatgagtcag ctgaaaattg tgacaaatca 840  
 cttcataccc tttttggaga caaattatgc acagttgcaa ctcttcgtga aacctatggt 900  
 gaaatggctg actgctgtgc aaaacaagaa cctgagagaa atgaatgctt cttgcaacac 960  
 aaagatgaca acccaaact cccccgattg gtgagaccag aggttgatgt gatgtgcact 1020  
 gcttttcatg acaatgaaga gacatttttg aaaaaatact tatatgaaat tgccagaaga 1080  
 catccttact tttatgcccc ggaactcctt ttctttgcta aaaggtataa agctgctttt 1140  
 acagaatggt gccaaagctc tgataaagct gcctgcctgt tgccaaagct cgatgaactt 1200

10

ES 2 746 264 T3

cgggatgaag ggaaggcttc gtctgccaaa cagagactca agtgtgccag tctccaaaa 1260  
 tttggagaaa gagctttcaa agcatgggca gtagctcgcc tgagccagag atttccaaa 1320  
 gctgagtttg cagaagtttc caagttagtg acagatctta ccaaagtcca cacggaatgc 1380  
 tgccatggag atctgcttga atgtgctgat gacagggcgg accttgccaa gtatatctgt 1440  
 gaaaatcaag attcgatctc cagtaaaactg aaggaatgct gtgaaaaacc tctgttgaa 1500  
 aaatcccact gcattgccga agtggaaaat gatgagatgc ctgctgactt gccttcatta 1560  
 gctgctgatt ttgttgaaag taaggatgtt tgcaaaaact atgctgaggc aaaggatgct 1620  
 ttccctgggca tgtttttgta tgaatatgca agaaggcatc ctgattactc tgtcgtgctg 1680  
 ctgctgagac ttgccaaagac atatgaaacc actctagaga agtgctgtgc cgctgcagat 1740  
 cctcatgaat gctatgccaa agtgttcgat gaatttaaac ctcttggtga agagcctcag 1800  
 aatttaatca aacaaaattg tgagcttttt gagcagcttg gagagtacaa attccagaat 1860  
 gcgctattag ttcgttacac caagaaagta cccaagtgt caactccaac tctttagag 1920  
 gtctcaagaa acctagaaa agtgggcagc aaatgttgta aacatcctga agcaaaaaga 1980  
 atgcctgtg cagaagacta tctatccgtg gtctgaacc agttatgtgt gttgcatgag 2040  
 aaaacgccag taagtgcag agtcacaaa tctgcacag aatccttggg gaacaggcga 2100  
 ccatgctttt cagctctgga agtcgatgaa acatacgttc ccaaagagtt taatgctgaa 2160  
 acattcacct tccatgcaga tatatgcaca ctttctgaga aggagagaca aatcaagaaa 2220  
 caaactgcac ttgttgagct cgtgaaacac aagccaagg caacaaaaga gcaactgaaa 2280  
 gctgttatgg atgatttcgc agcttttgta gagaagtgct gcaaggctga cgataaggag 2340  
 acctgctttg ccgaggaggg taaaaaactt gttgctgcaa gtcaagctgc cttaggctta 2400

<210> 69

<211> 2223

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 69

atgaccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
 gccgaggcgt gcacatgctc gccagccac cccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc 120  
 gtgatccggg ccaagggtgt ggggaagaag ctggtaaagg aggggcccctt cggcacgctg 180  
 gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag 240  
 tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta agctggaggt caacaagtac 300  
 cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
 gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcgaagg ggctgaaacta tccgtatcac 420  
 ctgggttgta acggtggagg tggagatgca cacaagagtg aggttgctca tccgatttaa 480

10



ES 2 746 264 T3

gatttgggag aagaaaatth caaagccttg gtgttgattg cctttgctca gtatcttcag 540  
cagtgtccat ttgaagatca tgtaaaatta gtgaatgaag taactgaatt tgcaaaaaca 600  
tgtgttgctg atgagtcagc tgaaaattgt gacaaatcac ttcataccct ttttgagac 660  
aaattatgca cagttgcaac tcttcgtgaa acctatgggtg aaatggctga ctgctgtgca 720  
aaacaagaac ctgagagaaa tgaatgcttc ttgcaacaca aagatgacaa cccaaacctc 780  
ccccgattgg tgagaccaga ggttgatgtg atgtgcaactg cttttcatga caatgaagag 840  
acatthttga aaaaatactt atatgaaatt gccagaagac atccttactt ttatgccccg 900  
gaactcctth tctttgctaa aaggataaa gctgctthta cagaatgttg ccaagctgct 960  
gataaagctg cctgcctgtt gccaaagctc gatgaacttc gggatgaagg gaagcttctg 1020  
tctgccaac agagactcaa gtgtgccagt ctccaaaaat ttggagaaag agctthcaaa 1080  
gcatgggcag tagctcgcct gagccagaga thtcccaaag ctgagthtgca agaagthtcc 1140  
aagttagtga cagatcttac caaagtccac acggaatgct gccatggaga tctgcttgaa 1200  
tgtgctgatg acagggcgga ccttgccaag tatatctgtg aaaatcaaga thcgatctcc 1260  
agtaaaactga aggaatgctg tgaaaaacct ctgttgghaa aatcccaactg cattgcccga 1320  
gtgghaaaatg atgagatgcc tgctgacttg ccttcattag ctgctgattt tghtghaaagt 1380  
aaggatgtht gcaaaaacta tgctgaggca aaggatgtct tcttgggcat gththtghat 1440  
ghaatatghaa gaaggcatcc tgattactct gtcgtgctgc tgctgagact tgccaagaca 1500  
tatghaaacca ctctagagaa gtgctgtgcc gctgcagatc ctcatghaatg ctatgcccaga 1560  
gtgttcgatg aatthaaacc tcttgthghaa gagcctcaga atthaatcaa acaaaattht 1620  
gagctththt agcagctthg agagtacaaa thccagaatg cgctattagt thgthtacacc 1680  
aagaaagtac cccaagtgtc aactccaact ctgttagagg thtcaagaaa cctaggaaaa 1740  
gtgggcagca aatgthghaa acatcctghaa gcaaaaagaa tgccctgtgc agaagactat 1800  
ctatcctgtg thctghaacca gthtatgtgtg thgcatghaa aaacgccagt aagtghacaga 1860  
gtcaccaaat gctghacaga atcctthgtg aacagggcac catgctthtcc agctctghaa 1920  
gtcgatghaa catacgtthc caaagagtht aatgctghaa cattcacctt ccatghacat 1980  
atatghacac thtctghagaa ghagagacaa atcaaghaac aaactghact tghtghagctc 2040  
gtghaaacaca agcccaggtc acaaaaagag caactghaag ctgthtatgha tghatthcga 2100  
gctththtgha agaagtgtg caaggtghac ghataaggha cctgctthtgc cgaggagghg 2160  
aaaaaactth ttgcccag thcagccgccc thtaggcttag thgaccatca thcatcatcat 2220  
cat 2223

<210> 70

<211> 2223

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 746 264 T3

<400> 70

atgacccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc	60
gccgagggcgt gcacatgctc gcccagccac ccccaggacg ccttctgcaa ctccgacatc	120
gtgatccggg ccagtgtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggcccaa tggcacgctg	180
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag	240
tacatccata cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta agctggaggt caacaagtac	300
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc	360
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcgaagg ggctgaacta tcggtatcac	420
ctgggttgta acggtggagg tggagatgca cacaagagtg aggttgctca tcgatttaa	480
gatttgggag aaaaaattt caaaccttg gtgttgattg cctttgctca gtatcttcag	540
cagtgtccat ttgaagatca tgtaaaatta gtgaatgaag taactgaatt tgcaaaaaca	600
tgtgttgctg atgagtcagc tgaaaattgt gacaaatcac ttcataccct ttttgagac	660
aaattatgca cagttgcaac tcttctgtaa acctatggtg aaatggctga ctgctgtgca	720
aaacaagaac ctgagagaaa tgaatgcttc ttgcaacaca aagatgacaa cccaaacctc	780
ccccgattgg tgagaccaga ggttgatgtg atgtgcaactg cttttcatga caatgaagag	840
acatTTTTga aaaaactt atatgaaatt gccagaagac atccttactt ttatgccccg	900
gaactccttt tctttgctaa aaggataaa gctgctttta cagaatgttg ccaagctgct	960
gataaagctg cctgcctggt gccaaagctc gatgaacttc gggatgaagg gaaggcttcg	1020
tctgcaaac agagactcaa gtgtgccagt ctccaaaaat ttggagaaag agctttcaaa	1080
gcatgggcag tagctcgcct gagccagaga ttcccaaaag ctgagtttgca agaagtttcc	1140
aagttagtga cagatcttac caaagtcac acggaatgct gccatggaga tctgcttgaa	1200
tgtgctgatg acagggcggc ccttgccaag tatatctgtg aaaatcaaga ttcgatctcc	1260
agtaaactga aggaatgctg tgaaaaacct ctgttggaat aatcccaactg cattgccgaa	1320
gtggaaaatg atgagatgcc tgctgacttg ccttcattag ctgctgattt tgttgaaagt	1380
aaggatgttt gcaaaaacta tgctgaggca aaggatgtct tcctgggcat gttttgtat	1440
gaatatgcaa gaaggcatcc tgattactct gtcgtgctgc tgctgagact tgccaagaca	1500
tatgaaacca ctctagagaa gtgctgtgcc gctgcagatc ctcatgaatg ctatgcaaaa	1560
gtgttcgatg aatttaaac tcttgggaa gagcctcaga atttaataca acaaaattgt	1620
gagctttttg agcagcttg agagtacaaa ttccagaatg cgctattagt tcgttacacc	1680
aagaaagtac cccaagtgtc aactccaact cttgtagagg tctcaagaaa cctaggaaaa	1740

ES 2 746 264 T3

```

gtgggcagca aatggtgtaa acatcctgaa gcaaaaagaa tgccctgtgc agaagactat      1800
ctatccgtgg tcctgaacca gttatgtgtg ttgcatgaga aaacgccagt aagtgcagaga      1860
gtcaccaaat gctgcacaga atccttggtg aacaggcgac catgcttttc agctctggaa      1920
gtcgatgaaa catacgttcc caaagagttt aatgctgaaa cattcacctt ccatgcagat      1980
atatgcacac tttctgagaa ggagagacaa atcaagaaac aaactgcact tgttgagctc      2040
gtgaaacaca agcccaaggc aacaaaagag caactgaaag ctgttatgga tgatttcgca      2100
gctttttag agaatgctg caaggctgac gataaggaga cctgctttgc cgaggagggg      2160
aaaaaacttg ttgcccag tcaggccgcc ttaggcttag tcgaccatca tcatcatcat      2220
cat                                                                           2223

```

<210> 71

<211> 585

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

```

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1                    5                    10                15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20                    25                    30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35                    40                    45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50                    55                    60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65                    70                    75                    80

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

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

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115                   120                   125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130                   135                   140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg

```

10



ES 2 746 264 T3

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys  
 420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys  
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His  
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser  
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr  
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
 500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
 515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
 545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val  
 565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 580 585

<210> 72

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30

10

ES 2 746 264 T3

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly Lys  
 225

<210> 73

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

10 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 1 5 10 15

ES 2 746 264 T3

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

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Thr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 115 120 125

Asn Lys Thr Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 145 150 155 160

Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 165 170 175

Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 210 215

<210> 74

<211> 212

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 1 5 10 15

ES 2 746 264 T3

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

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 35 40 45

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 50 55 60

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 65 70 75 80

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 85 90 95

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 100 105 110

Val Thr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Asn Lys Thr Gln Val  
 115 120 125

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 130 135 140

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro  
 145 150 155 160

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr  
 165 170 175

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 180 185 190

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 195 200 205

Ser Pro Gly Lys  
 210

<210> 75

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector

10 <400> 75

Glu Pro Lys Ser Ser

1

5



**REIVINDICACIONES**

1. Una muteína de TIMP-3 aislada que tiene una región madura que es al menos 90 % idéntica en secuencia de aminoácidos a la región madura de TIMP-3 expuesta en SEQ ID NO:2 o una muteína de TIMP-3 que tiene una región madura que es al menos 90 % idéntica en secuencia de aminoácidos a los aminoácidos 24-211 de SEQ ID NO:2, seleccionada del grupo que consiste en:
  - a) una muteína de TIMP-3 que tiene las mutaciones H78N/Q80T, K94N/E96T, D110N/K112T y R138T, opcionalmente en combinación con una o más de las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en K45N/V47T; K50N/V52T; y P56N/G58T;
  - b) la muteína de TIMP-3 según a) que comprende además una mutación adicional G173T; y
  - c) la muteína de TIMP-3 según a) o b) que comprende además la mutación F57N.
2. La muteína de TIMP-3 de la reivindicación 1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:26.
3. La muteína de TIMP-3 de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 fusionada o conjugada con un resto que prolonga la semivida de un polipéptido, opcionalmente en donde la muteína de TIMP-3 está fusionada con un anticuerpo, una porción Fc de un anticuerpo, la cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo, o albúmina de suero humano.
4. La muteína de TIMP-3 de la reivindicación 3 conjugada con polietilenglicol.
5. Un ácido nucleico aislado que codifica una muteína de TIMP-3 según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
6. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 5.
7. Una célula hospedadora aislada transformada o transfectada con el vector de expresión de la reivindicación 6.
8. Un método de producción de una muteína de TIMP-3 recombinante que comprende cultivar la célula hospedadora transformada o transfectada de la reivindicación 7 en condiciones que promueven la expresión de la muteína de TIMP-3, y recuperar la muteína de TIMP-3.
9. Una composición que comprende la muteína de TIMP-3 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un diluyente, excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable.
10. La composición de la reivindicación 9 para su uso en terapia.
11. La composición de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de una afección en la que metaloproteasas de matriz (MMPs) y/u otras proteinasas que se inhiben o inhibibles por TIMP-3 desempeñan una función causante o agravante, en donde la afección
  - (a) se selecciona del grupo que consiste en afecciones inflamatorias, osteoartritis, isquemia miocárdica, lesión por reperfusión y progresión a insuficiencia cardíaca congestiva;
  - (b) se selecciona del grupo que consiste en asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, miocarditis, inflamación relacionada con aterosclerosis y afecciones artríticas;
  - (c) se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide y artritis psoriásica, miocarditis viral, epidermolísis bullosa distrófica, osteoartritis, pseudogota, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad periodontal, ulceración, cicatrización después de cirugía, reestenosis, enfisema, enfermedad de Paget en el hueso, osteoporosis, esclerodermia, atrofia por compresión de hueso o tejidos como en úlceras de decúbito, colesteatoma, cicatrización anormal, artritis reumatoide pauciarticular, artritis reumatoide poliarticular, artritis reumatoide de aparición sistémica, espondilitis anquilosante, artritis enteropática, artritis reactiva, síndrome SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía, artropatía), dermatomiositis, artritis psoriásica, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, miolitis, polimiolitis, dermatomiositis, osteoartritis, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis, polimialgia reumática, sarcoidosis, esclerosis, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, síndrome de Sjogren, psoriasis, psoriasis en placas, psoriasis guttata, psoriasis inversa, psoriasis pustular, psoriasis eritrodérmica, dermatitis, dermatitis atópica, aterosclerosis, lupus, enfermedad de Still, lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, celiaquía, esprúe tropical, enteropatía asociada a artropatías seronegativas, colitis microscópica o colagenosa, gastroenteritis eosinofílica, pouchitis resultante después de proctocolectomía y anastomosis ileoanal, pancreatitis, diabetes mellitus dependiente de insulina, mastitis, colecistitis, colangitis, pericolangitis, esclerosis múltiple (EM), asma, asma extrínseca, asma intrínseca, hipersensibilidad de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis crónica, enfisema, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), síndrome disneico, fibrosis quística, hipertensión pulmonar, vasoconstricción pulmonar, lesión pulmonar aguda, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, bronquitis, bronquitis alérgica-bronquiectasia, tuberculosis, alveolitis alérgica, asma ocupacional,

- 5 trastornos de tipo asma, sarcoides, síndrome (o disfunción) por enfermedad reactiva de las vías respiratorias, bisinosis, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinofílico, rinitis, sinusitis y enfermedad parasitaria pulmonar, hipersensibilidad de las vías respiratorias asociada a afecciones inducidas por virus, enfermedad de Guillain-Barre, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, fenómeno de Raynaud, hepatitis autoinmune, enfermedad injerto contra huésped (EICH), isquemia cerebral, lesión cerebral traumática, esclerosis múltiple, neuropatía, miopatía, lesión de la médula espinal y esclerosis lateral amiotrófica (ELA); o
- (d) se selecciona del grupo que consiste en estabilización de placas vasculares, vasculopatía, formación de neoíntima, lesión pulmonar aguda y síndrome disneico agudo.
- 10 12. La composición para su uso de la reivindicación 10, en donde la composición inhibe la degradación o remodelación cardíaca adversa de matriz extracelular cardíaca (MEC) en un sujeto.
13. La composición para su uso según la reivindicación 12, en donde el sujeto ha sufrido un infarto de miocardio.

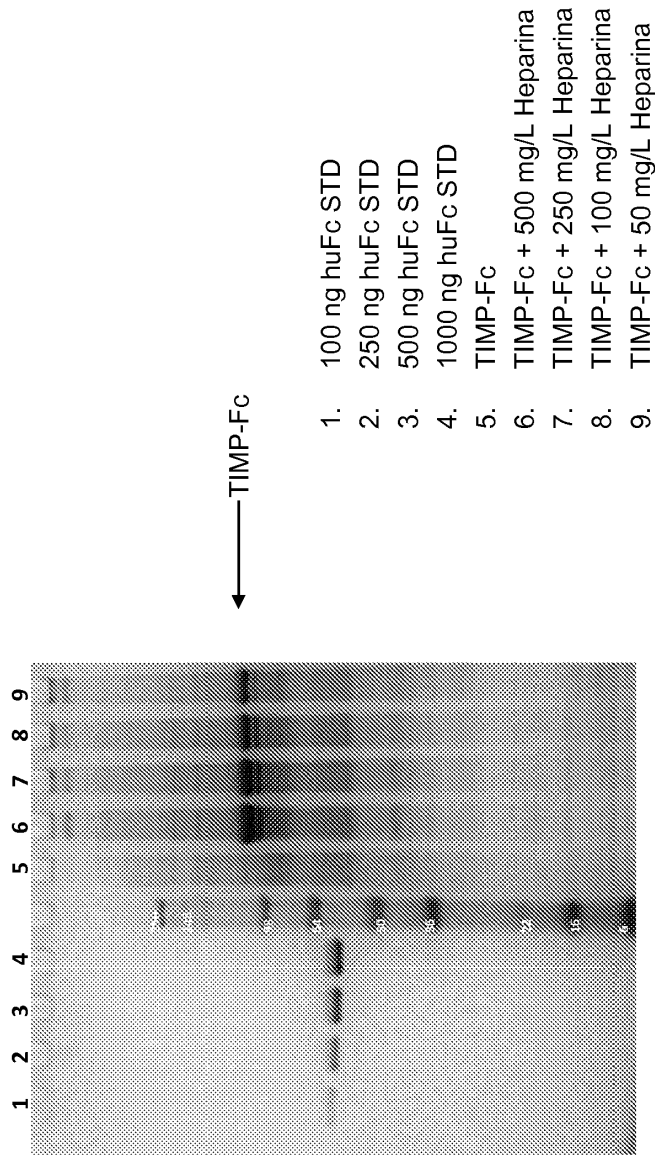


FIGURA 1

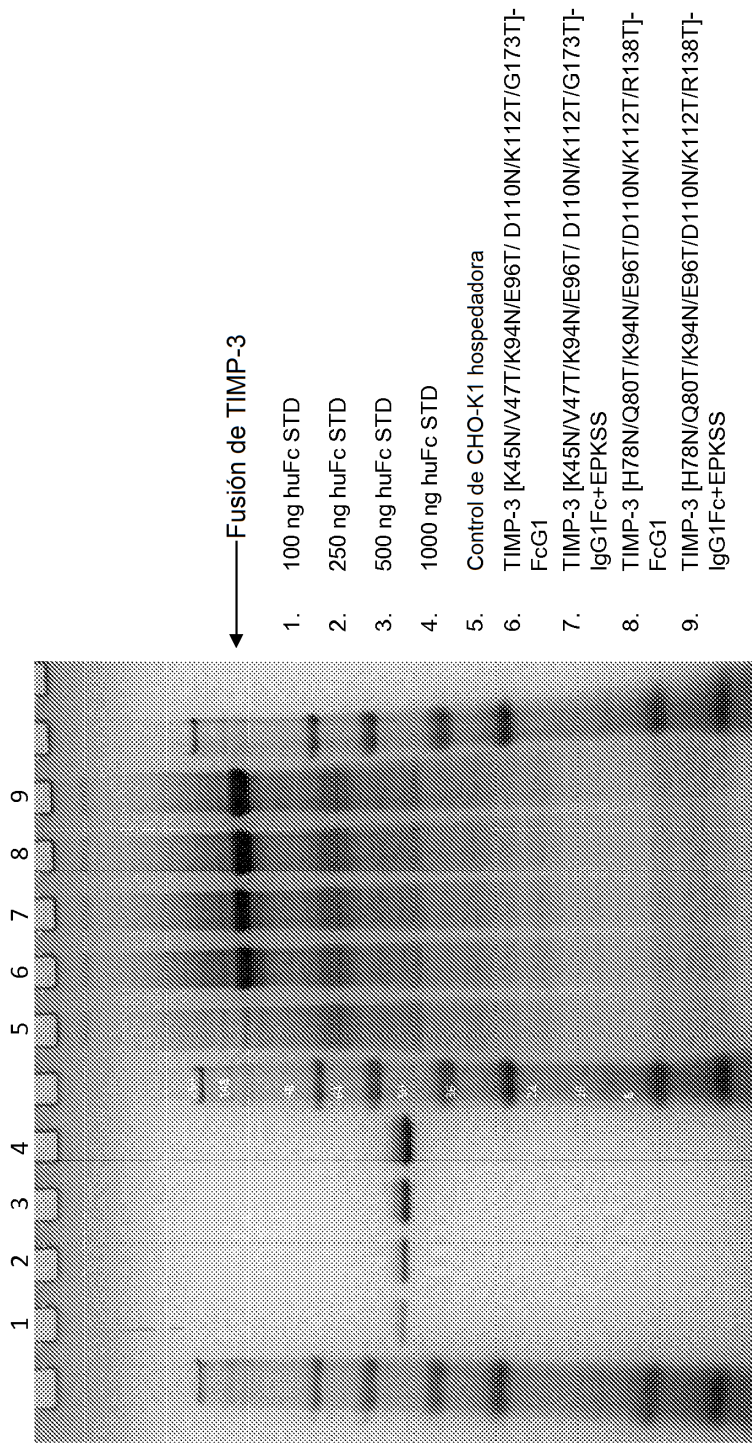
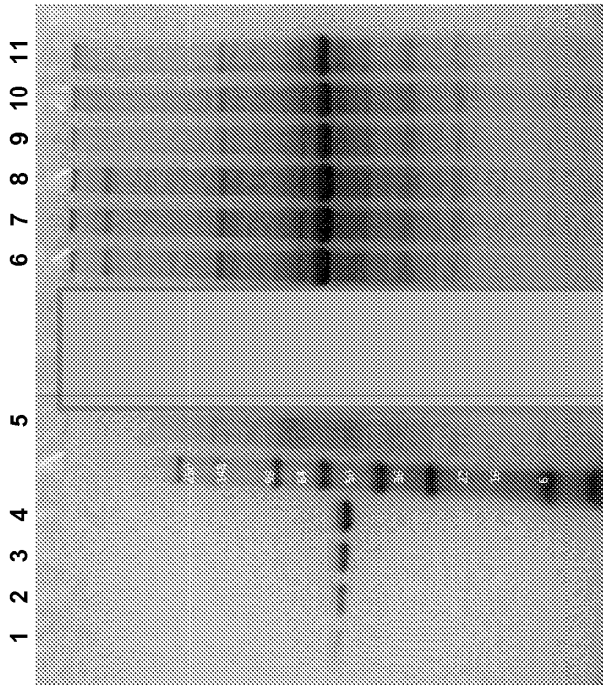


FIGURA 2



1. 100 ng huFc STD
2. 250 ng huFc STD
3. 500 ng huFc STD
4. 1000 ng huFc STD
5. Control endógeno de CHO-K1
6. Conjunto 1 de N-TIMP-HSA con heparina
7. Conjunto 2 de N-TIMP-HSA con heparina
8. Conjunto 3 de N-TIMP-HSA con heparina
9. Conjunto 1 de N-TIMP-HSA sin heparina
10. Conjunto 2 de N-TIMP-HSA sin heparina
11. Conjunto 3 de N-TIMP-HSA sin heparina

FIGURA 3

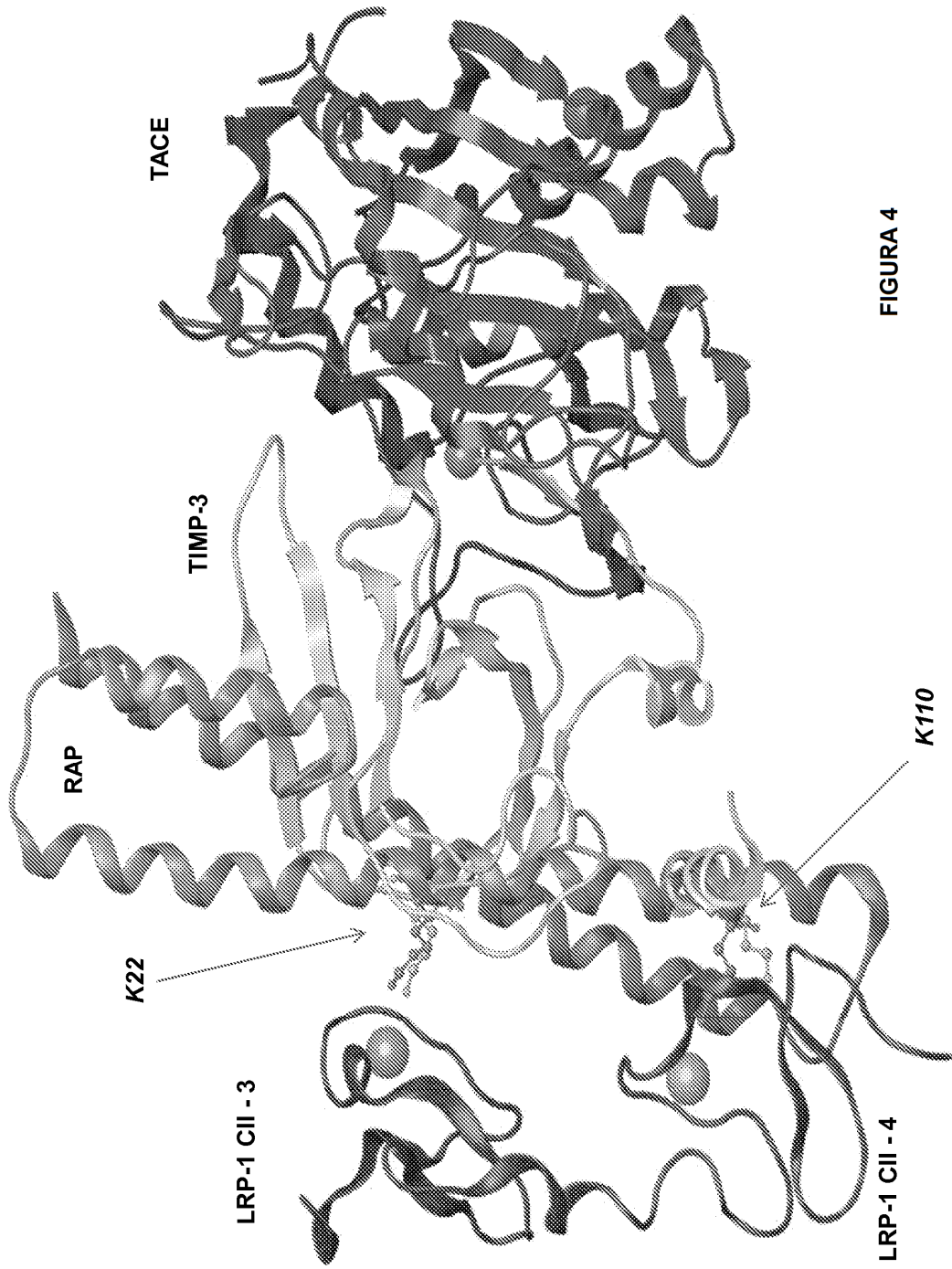


FIGURA 4

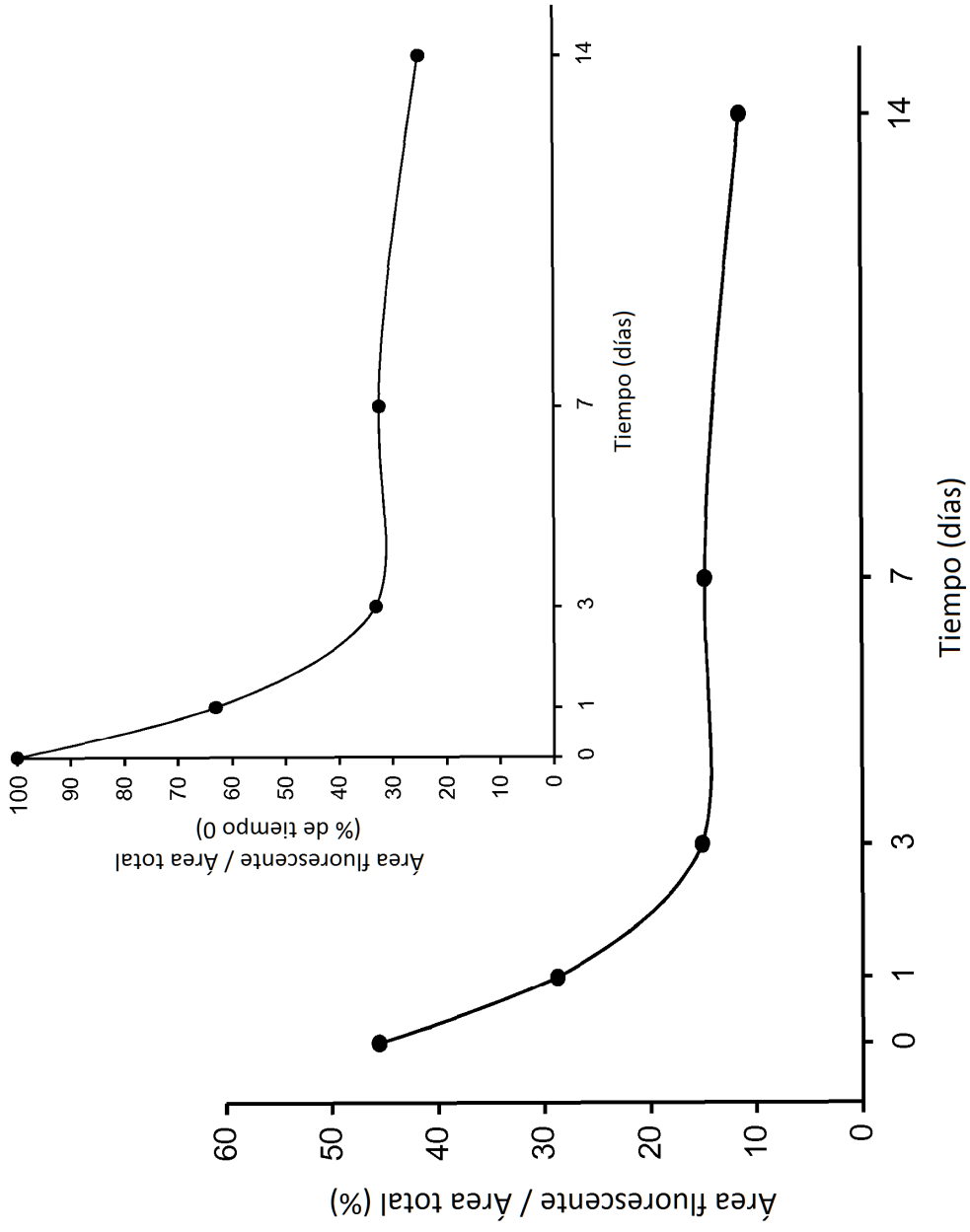


FIGURA 5

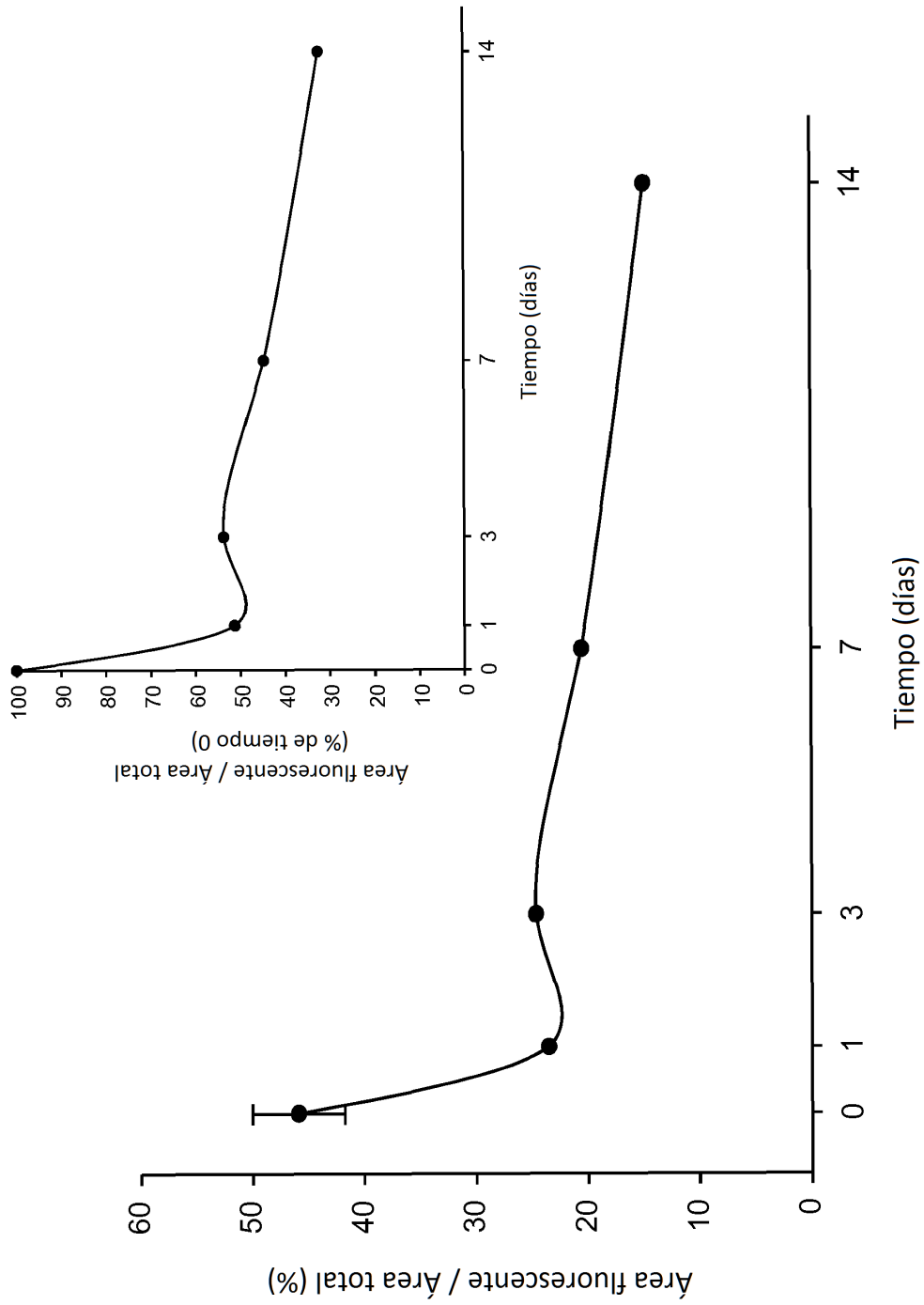


FIGURA 6



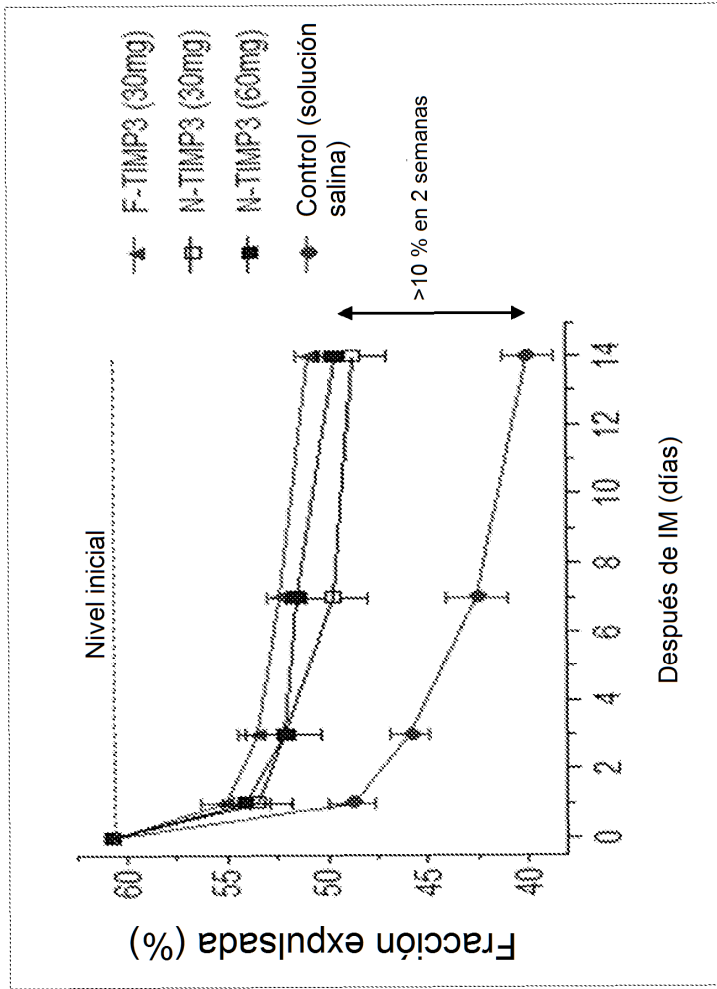
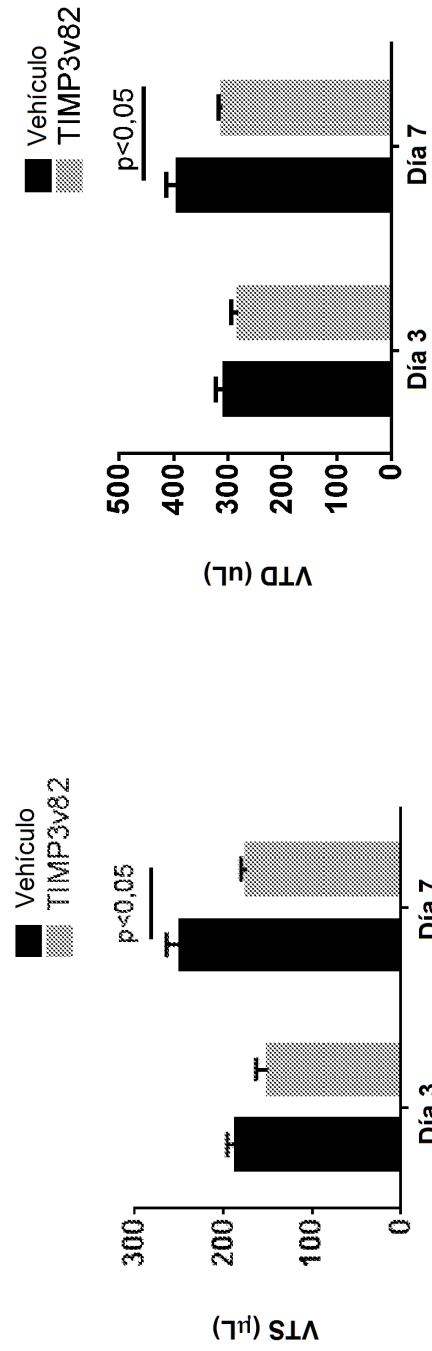
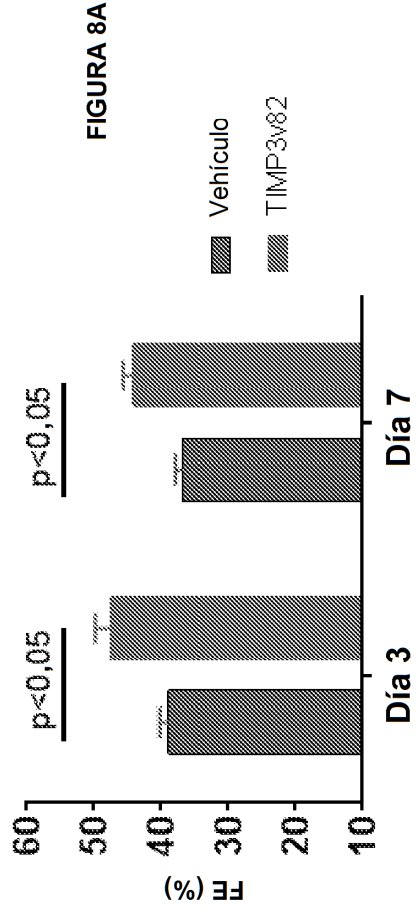


FIGURA 7



**FIGURA 8B**

**FIGURA 8C**

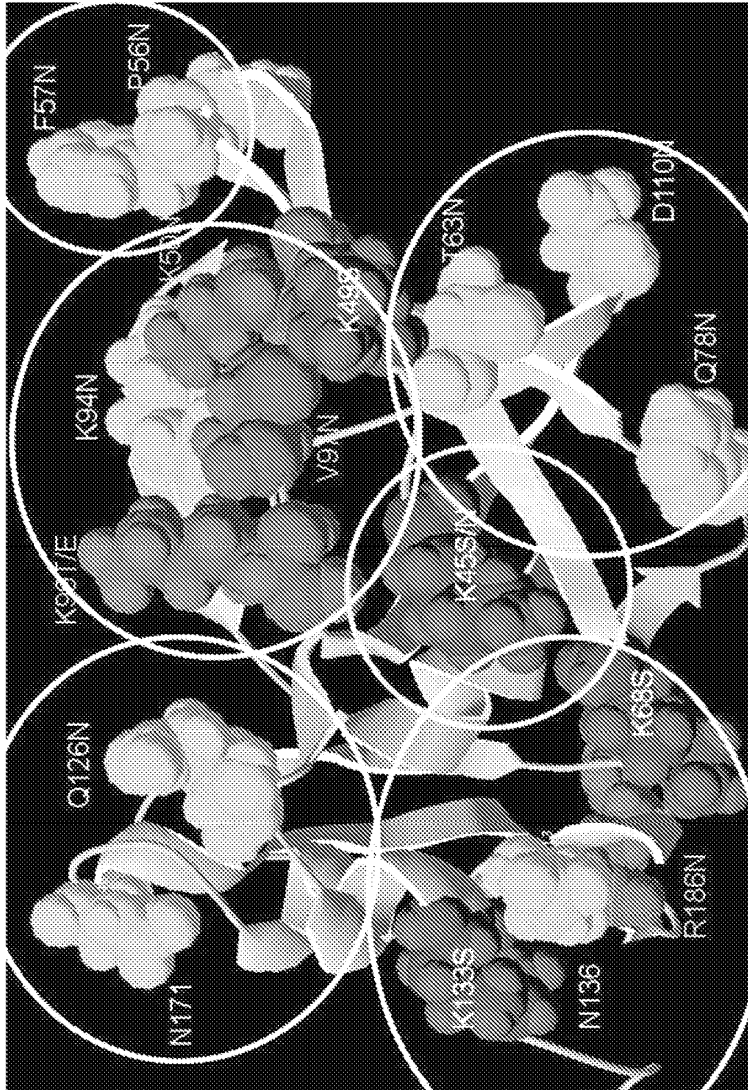


FIGURA 9

# ES 2 746 264 T3

SEQ ID NO:1 ADNc de huTIMP3 nativa  
atgacccctt ggctcgggct catcgtgctc ctgggcagct ggagcctggg ggactggggc 60  
gccgaggcgt gcacatgctc gccagccac ccccaggacg ccttctgcaa ctcccacatc 120  
gtgatccggg ccaagtggt ggggaagaag ctggtaaagg aggggccctt cggcacgctg 180  
gtctacacca tcaagcagat gaagatgtac cgaggcttca ccaagatgcc ccatgtgcag 240  
tacatccaca cggaagcttc cgagagtctc tgtggcctta agctggaggt caacaagtac 300  
cagtacctgc tgacaggtcg cgtctatgat ggcaagatgt acacggggct gtgcaacttc 360  
gtggagaggt gggaccagct caccctctcc cagcgcaagg ggctgaacta tcggtatcac 420  
ctgggttgta actgcaagat caagtcctgc tactacctgc cttgctttgt gacttccaa 480  
aacgagtgtc tctggaccga catgctctcc aatttcggtt accctggcta ccagtccaaa 540  
cactacgctt gcatccggca gaagggcggc tactgcagct ggtaccgagg atgggcccc 600  
ccgataaaa gcatcatcaa tgccacagac ccc 633

SEQ ID NO:2 aminoácido de huTIMP3 nativa  
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKLVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTTEASESLCGLKLEVNKYQYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYRHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:3 huTIMP3(K45N, V47T, P56N, G58T, Q126N, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRANVTGKLVKEGNFTTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTTEASESLCGLKLEVNKYQYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDNLTLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:4 huTIMP3(K45N, V47T, P56N, G58T, K94N, E96T, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRANVTGKLVKEGNFTTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:5 huTIMP3(K45N, V47T, P56N, G58T, R138T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRANVTGKLVKEGNFTTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:6 huTIMP3(K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRANVTGKLVKEGPNGLTVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYRHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:7 huTIMP3(K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRANVTGKLVKEGPNGLTVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:8 huTIMP3(K45N, V47T, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRANVTGKLVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPNVTYIHTTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

**FIGURA 10A**

# ES 2 746 264 T3

SEQ ID NO:9 huTIMP3(K45N, V47T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDAFCNSDIVIRANVTGKLVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYNGTMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:10 huTIMP3(K45N, V47T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDAFCNSDIVIRANVTGKLVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYNGTMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYRYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:11 huTIMP3(K45N, V47T, K94N, E96T, R138T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDAFCNSDIVIRANVTGKLVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGMKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:12 huTIMP3(K45S, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDAFCNSDIVIRASVVGKLVKEGPNGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYNGTMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:13 huTIMP3(K45S, F57N, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDAFCNSDIVIRASVVGKLVKEGPNGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPNVTYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGMKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:14 huTIMP3(K50N, V52T P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T,  
R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDAFCNSDIVIRAKVVGKNLTKEGNFTTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYNGTMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:15 huTIMP3(K50N, V52T, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDAFCNSDIVIRAKVVGKNLTKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPNVTYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGMKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:16 huTIMP3(K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDAFCNSDIVIRAKVVGKNLTKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYNGTMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:17 huTIMP3(K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDAFCNSDIVIRAKVVGKNLTKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYNGTMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

**FIGURA 10B**

# ES 2 746 264 T3

SEQ ID NO:18 huTIMP3(K50N, V52T, K94N, E96T, R138T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKNLTKEGPFGTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:19 huTIMP3(K50N, V52T, Q126N, R138T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKNLTKEGPFGTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLKLEVNKYQYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDNLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:20 huTIMP3(P56N, G58T, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKLVKEGNFTTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPNVTYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:21 huTIMP3(P56N, G58T, K94N, E96T, Q126N, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKLVKEGNFTTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDNLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:22 huTIMP3(P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKLVKEGNFTTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYNGTMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:23 huTIMP3(P56N, G58T, H78N, Q80T, K94N, E96T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKLVKEGNFTTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPNVTYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYRTHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:24 huTIMP3(P56N, G58T, Q126N, R138T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKLVKEGNFTTLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPHVQYIHTEASESLCGLKLEVNKYQYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDNLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:25 huTIMP3(H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, G173T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKLVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPNVTYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFTYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

SEQ ID NO:26 huTIMP3(H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T)  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKLVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFT  
KMPNVTYIHTEASESLCGLNLTVNKYQYLLTGRVYNGTMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYTYHLGCNCKIK  
SCYYLPCFVTSKNECLWTDMLSNFGYPGYQSKHYACIRQKGGYCSWYRGWAPPDKSIINATDP

**FIGURA 10C**