

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 433**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/30** (2015.01)

**C12N 5/079** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2014 PCT/JP2014/081917**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15080297**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2014 E 14831100 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3074508**

54 Título: **Aplicación de laminina a cultivos de células endoteliales de la córnea**

30 Prioridad:

**27.11.2013 JP 2013244972**

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

**28.05.2020**

73 Titular/es:

**KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION (33.3%)  
465 Kajii-cho, Kawaramachi-dori, Hirokoji-agaru,  
Kamigyo-ku  
Kyoto-shi, Kyoto 602-8566, JP;  
THE DOSHISHA (33.3%) y  
SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**KOIZUMI, NORIKO;  
OKUMURA, NAOKI;  
KINOSHITA, SHIGERU;  
KRUSE, FRIEDRICH E. y  
SCHLOETZER-SCHREHARDT, URSULA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 763 433 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

Aplicación de laminina a cultivos de células endoteliales de la córnea

### **[Descripción detallada de la invención]**

#### **[Campo técnico]**

5 La presente invención se refiere al uso de laminina como un componente para el cultivo o el crecimiento de cultivos de células endoteliales de la córnea.

#### **[Antecedentes de la técnica]**

10 Las células endoteliales de la córnea humana están presentes a una densidad de aproximadamente 3000 células por milímetro cuadrado en el nacimiento. Sin embargo, una vez deterioradas, las células endoteliales de la córnea humana no tienen capacidad de regenerarse. Como tales, las células endoteliales de la córnea se consideran difíciles de cultivar. Debido al estado actual, en que es difícil cultivar o hacer crecer células endoteliales de la córnea en técnicas de trasplante, un tratamiento o cirugía sobre un endotelio de córnea es prácticamente imposible. Hay una escasez de donación de córneas en Japón, donde se llevan a cabo aproximadamente 1700 casos de trasplantes de córneas anualmente de forma ambulatoria en comparación con los aproximadamente 2600 pacientes en espera de trasplante de córnea.

#### **[Listado de citas]**

#### **[Referencias de patentes]**

20 [PTL 1] Publicación japonesa abierta a consulta n.º 2011-78370  
[PTL 2] Documento WO 2013/047763  
[PTL 3] Documento WO 2011/024070  
[PTL 4] Documento WO 2010/140464

#### **[Referencias no de patentes]**

25 [NPTL 1] Journal of the Medical Society of Toho University Vol.56, N.º 1, Página. 39 (01.01.2009)  
[NPTL 2] Nippon Ganka Gakkai Zasshi [Journal of Japanese Ophthalmological Society] Vol.105, edición extra, Página.196 (15.03.2001)  
[NPTL 3] J Biol Chem. Sep 13, 2013. [Publicación electrónica antes de impresión]  
[NPTL 4] PLoS One. 2013; 8(1):e53648. doi: 10.1371/journal.pone.0053648. Publicación electrónica Ene 7, 2013  
[NPTL 5] Cell Adh Migr. Ene-Feb 2013; 7(1):142-9. doi: 10.4161/cam.22125. Publicación electrónica Oct 17, 2012  
[NPTL 6] J Cell Biochem. Feb 15, 2007; 100(3):545-56.

#### **[Sumario de la invención]**

#### **[Solución al problema]**

35 Los inventores de la presente solicitud han consumado la presente invención descubriendo que una laminina específica es útil para el cultivo y el crecimiento de endotelios de la córnea. Por consiguiente, la presente invención representa los siguientes artículos representativos:

La presente invención se refiere al uso de un agente seleccionado entre el grupo que consiste en la laminina 511, la laminina 512, o el fragmento de laminina 511-E8 que se expresa en células endoteliales de la córnea en un procedimiento para promover el crecimiento de las células endoteliales de la córnea.

En una realización, las lamininas comprenden laminina 511 (alfa5 beta1 gamma1) y laminina 521 (alfa5 beta2 gamma 1).

40 En una realización, el fragmento de laminina tiene capacidad de adhesión celular de las células endoteliales de la córnea.

En una realización, las células endoteliales de la córnea son de ser humano.

En una realización, el agente está presente en un medio.

En una realización, el agente se reviste sobre un recipiente de cultivo.

45 Se desvela también en el presente documento:

(1) Una composición para cultivar o hacer crecer células endoteliales de la córnea, que comprende al menos un agente que consiste en lamininas y fragmentos de las mismas que se expresan en células endoteliales de la córnea.

(2) La composición de acuerdo con el artículo 1, en la que las lamininas comprenden laminina 511 (alfa5 beta1

gamma1) y laminina 512 (alfa5 beta2 gamma 1).

(3) La composición de acuerdo con el artículo 1 o 2, en la que los fragmentos promueven la capacidad de adhesión celular de las células endoteliales de la córnea.

5 (4) La composición de acuerdo con una cualquiera de los artículos 1-3, en la que el agente es laminina 511, laminina 521 o un fragmento de laminina 511-E8.

(5) La composición de acuerdo con una cualquiera de los artículos 1-4, en la que las células endoteliales de la córnea son de ser humano.

(6) Un medio para cultivar células endoteliales de la córnea, que comprende la composición de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-5.

10 (7) Un recipiente de cultivo para células endoteliales de la córnea, que se reviste con la composición de acuerdo con el artículo 1.

(8) Un procedimiento para cultivar células endoteliales de la córnea que comprende la etapa de utilizar la composición de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-5.

15 (9) Un procedimiento para cultivar células endoteliales de la córnea que comprende la etapa de utilizar el medio de acuerdo con el artículo 6.

(10) Un procedimiento para cultivar células endoteliales de la córnea que comprende la etapa de utilizar el recipiente de acuerdo con el artículo 7.

### **[Efectos ventajosos de la invención]**

20 La presente invención proporciona un componente que permite el cultivo, el mantenimiento, y el crecimiento de células endoteliales de la córnea (en particular, células endoteliales de la córnea humana).

### **[Breve descripción de los dibujos]**

25 La Figura 1 es un diagrama que muestra la expresión del ARNm de diversas cadenas de laminina en células endoteliales de la córnea humana. El diagrama, desde la izquierda, muestra un marcador de pesos moleculares, una cadena  $\alpha 1$ , cadena  $\alpha 2$ , cadena  $\alpha 3$ , cadena  $\alpha 4$ , cadena  $\alpha 5$ , cadena  $\beta 1$ , cadena  $\beta 2$ , cadena  $\beta 3$ , cadena  $\beta 4$ , cadena  $\gamma 1$ , cadena  $\gamma 2$ , y cadena  $\gamma 3$  de la laminina.

La Figura 2 muestra la expresión del ARNm de diversas cadenas de integrina en células endoteliales de la córnea humana. La hilera superior, desde la izquierda, muestra la cadena  $\alpha 1$ , cadena  $\alpha 2$ , cadena  $\alpha 3$ , cadena  $\alpha 4$ , cadena  $\alpha 5$ , cadena  $\alpha 6$ , cadena  $\alpha 7$ , cadena  $\alpha 8$ , cadena  $\alpha 9$ , cadena  $\alpha 10$ , cadena  $\alpha 11$ , cadena  $\alpha E$ , cadena  $\alpha V$ , y cadena  $\alpha L$  de la integrina. La hilera inferior, desde la izquierda, muestra la cadena  $\alpha M$ , cadena  $\alpha X$ , cadena  $\alpha D$ , cadena  $\alpha IIb$ , cadena  $\beta 1$ , cadena  $\beta 2$ , cadena  $\beta 3$ , cadena  $\beta 4$ , cadena  $\beta 5$ , cadena  $\beta 6$ , cadena  $\beta 7$ , y cadena  $\beta 8$  de la integrina. La Figura 3A-Figura 3C muestra en su conjunto el análisis de expresión de diversas cadenas de integrina en células endoteliales de la córnea humana mediante citometría de flujo. La Figura 3A muestra el análisis de expresión de diversas cadenas de integrina en células endoteliales de la córnea humana mediante citometría de flujo. La hilera superior, desde la izquierda, muestra las integrinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y  $\alpha 3$ . La hilera inferior, desde la izquierda, muestra las integrinas  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ , y  $\alpha 6$ .

35 La Figura 3B muestra también el análisis de expresión de diversas cadenas de integrina en células endoteliales de la córnea humana mediante citometría de flujo. La hilera superior, desde la izquierda, muestra las integrinas  $\alpha E$ ,  $\alpha V$ , y  $\alpha L$ . La hilera inferior, desde la izquierda, muestra las integrinas  $\alpha M$ ,  $\alpha X$ , y  $\alpha IIb$  (CD41a).

40 La Figura 3C muestra también el análisis de expresión de diversas cadenas de integrina en células endoteliales de la córnea humana mediante citometría de flujo. La hilera superior, desde la izquierda, muestra las integrinas  $\alpha IIb$  (CD41b),  $\beta 1$ , y  $\beta 2$ . La hilera inferior, desde la izquierda, muestra las integrinas  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ , y  $\beta 7$ .

La Figura 4 es una fotografía que muestra que la laminina 511 y la laminina 521 promueven la adhesión celular de las células endoteliales de la córnea humana. La hilera superior, desde la izquierda, muestra la laminina 511, la laminina 521, y la laminina 211. La hilera inferior, desde la izquierda, no muestra revestimiento, revestimiento de FNC, y revestimiento de gelatina. La escala es 50  $\mu m$ .

45 La Figura 5 es una gráfica que muestra que la laminina 511 y la laminina 521 promueven la adhesión celular de las células endoteliales de la córnea humana. El eje y indica el número de células (% del control). El eje x, desde la izquierda, no indica revestimiento (control), laminina 511, laminina 521, laminina 211, revestimiento de FNC, revestimiento de gelatina, y fragmento 511-E8 de laminina.

50 La Figura 6 es una gráfica que muestra que un fragmento de laminina 511-E8 promueve la adhesión celular de las células endoteliales de la córnea humana. El eje y indica el número de células (% del control). El eje x, desde la izquierda, no indica revestimiento (control), cada concentración de fragmentos de laminina 511-E8 (en orden: 0,001  $\mu g/cm^2$ , 0,01  $\mu g/cm^2$ , 0,1  $\mu g/cm^2$ , 0,5  $\mu g/cm^2$ , 1,0  $\mu g/cm^2$ , y 1,5  $\mu g/cm^2$ ), y la mezcla de revestimiento de FNC.

55 La Figura 7 es un gráfico que muestra que la laminina 511, la laminina 521, y los fragmentos de laminina 511-E8 promueven la adhesión celular de las células endoteliales de la córnea humana. El eje y indica el valor relativo (%) de la absorbancia de BrdU con respecto al control. El eje x, desde la izquierda, no indica revestimiento (control), laminina 511, laminina 521, laminina 211, mezcla de revestimiento de FNC, y fragmentos de laminina 511-E8 (desde la izquierda, 0,5  $\mu g/cm^2$ , 1,0  $\mu g/cm^2$ , y 1,5  $\mu g/cm^2$ ).

60 La Figura 8 es una fotografía de un microscopio de contraste de fases en el día 2 del cultivo, que muestra que la laminina 511 y la laminina 521 potencian la eficacia de cultivar células endoteliales de la córnea. La parte superior izquierda muestra la laminina 511, la parte inferior derecha muestra la laminina 521, la parte inferior izquierda muestra la laminina 211, y la parte inferior derecha no muestra revestimiento. La barra indica 100  $\mu m$ .

La Figura 9 es una fotografía de un microscopio de contraste de fases en el día 20 del cultivo, que muestran que la laminina 511 y la laminina 521 permiten cultivar células endoteliales de la córnea humana a una alta densidad. La parte superior izquierda muestra la laminina 511, la parte inferior derecha muestra la laminina 521, la parte inferior izquierda muestra la laminina 211, y la parte inferior derecha no muestra revestimiento. La barra indica 100  $\mu\text{m}$ .

La Figura 10 es una fotografía que muestra que la laminina 511 y la laminina 521 permiten cultivar células endoteliales de la córnea humana a una alta densidad celular. El colorante rojo indica Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa y el colorante azul indica DAPI. La parte superior izquierda muestra la laminina 511, la parte inferior derecha muestra la laminina 521, la parte inferior izquierda muestra la laminina 211, y la parte inferior derecha no muestra revestimiento. La barra indica 100  $\mu\text{m}$ .

La Figura 11 es una fotografía que muestra que la laminina 511 y la laminina 521 permiten cultivar células endoteliales de la córnea humana a una alta densidad celular. El colorante verde indica ZO-1 y el colorante azul indica DAPI. La parte superior izquierda muestra la laminina 511, la parte inferior derecha muestra la laminina 521, la parte inferior izquierda muestra la laminina 211, y la parte inferior derecha no muestra revestimiento. La barra indica 100  $\mu\text{m}$ .

La Figura 12 es un gráfico que indica que la adhesión celular de una célula endotelial de la córnea humana está promovida incluso en un cultivo en el que la laminina 521 y el fragmento de laminina 511-E8 se añaden a un medio de cultivo. El eje y indica el número de células (% del control). El eje x, desde la izquierda, no indica revestimiento (control), cada concentración de laminina 521 (en orden: 1,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 2,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 4,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), cada concentración de los fragmentos de laminina 511-E8 (en orden: 1,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 2,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 4,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), y la mezcla de revestimiento de FNC.

### **Descripción de las realizaciones**

La presente invención se describe a continuación. A lo largo de la presente memoria descriptiva, una expresión en forma singular debe entenderse como que abarca la forma plural del concepto salvo que se indique específicamente otra cosa. Por consiguiente, un artículo singular (por ejemplo, "un", "uno/a", "el/la" y similares en Inglés) debe entenderse que abarcan la forma plural del concepto salvo que se indique específicamente otra cosa. Además, los términos usados en el presente documento deben entenderse que se usan en el significado como convencionalmente se usa en la técnica salvo que se indique de forma específica otra cosa. Por consiguiente, a menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y la terminología científica específica utilizados en el presente documento utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención. en el caso de una contradicción, prevalecerá la presente memoria descriptiva (incluyendo las definiciones).

(Definición)

Como se usa en el presente documento, "célula endotelial de la córnea" se usa en el significado que convencionalmente se usa en la técnica. La córnea es uno de los tejidos laminares que constituyen un ojo. La córnea es transparente y está localizada en la parte más próxima al entorno externo. En seres humanos, la córnea se considera como consistente en cinco capas, en orden desde el exterior (superficie del cuerpo), el epitelio de la córnea, la membrana de Bowman, la sustancia propia, la membrana de Descemet (membrana basal del endotelio de córnea), y el endotelio de córnea. En particular, salvo que se especifique otra cosa, las partes diferentes de las del epitelio y el endotelio pueden denominarse juntas como "estroma de la córnea" y se denominan como tales en el presente documento. Como se usa en el presente documento, "HCEC" es una abreviatura de células endoteliales de la córnea humana. Se entiende que para las células endoteliales usadas en la presente invención, se pueden usar células de origen natural, así como células diferenciadas a partir de un citoblasto, es decir, células inducidas por diferenciación a partir de IPS o similares.

Como se usa en el presente documento, "aislado" se refiere a un estado en el que la cantidad de materiales que se reúnen naturalmente en las células en un entorno normal es al menos reducida, y preferentemente un estado de estar prácticamente exentas de dichos materiales. Por consiguiente, una célula, tejido o similar aislada se refiere a una célula que está sustancialmente exenta de otros materiales (por ejemplo, otras células, proteínas, o ácidos nucleicos) que se reúnen en la célula en un entorno natural.

Como se usa en el presente documento, "formulación endotelial de la córnea" se refiere a cualquier formulación o agente medicinal que comprende el endotelio de córnea o una célula del endotelio de córnea. Debido a que se pueden formular las células endoteliales de la córnea que se producen y cultivan con un procedimiento de la presente invención, se puede fabricar una formulación/agente endotelial de la córnea usando células endoteliales de la córnea que se cultivan y producen con un procedimiento de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "matriz extracelular" se denomina también (ECM) y se refiere a un material que existe entre células somáticas, independientemente de si la célula es una célula epitelial o una célula no epitelial. Debido a que una matriz extracelular se produce generalmente por células, una matriz extracelular es un material biológico. Un dominio extracelular está implicado no solo en el tejido de apoyo sino también en la constitución del entorno interno necesario para la supervivencia de todas las células somáticas. Una matriz extracelular se produce generalmente a partir de células de tejido conectivo. Sin embargo, algunas son secretadas a partir de las propias

- células que tienen una membrana basal, tales como una célula epitelial o una célula endotelial. Una matriz extracelular se divide básicamente en componentes fibrosos y una matriz que rellena el espacio entre los componentes fibrosos. Los componentes fibrosos incluyen fibras de colágeno y fibras elásticas. El constituyente básico de la matriz es glucosamino glicano (mucopolisacárido ácido), cuya mayoría forma una macromolécula de proteoglicanos (complejo de mucopolisacárido ácido-proteína) mediante la unión con una proteína no de colágeno. Además, la matriz comprende laminina en la membrana basal, microfibrillas en la periferia de las fibras elásticas, fibras, y una glicoproteína tal como fibronectina sobre la superficie celular. la estructura básica es la misma en el tejido especializado. Por ejemplo, en el cartílago hialino, se produce una matriz de cartílago que comprende una cantidad característicamente grande de proteoglicanos por un condrioblasto, y en el hueso, se produce una matriz ósea en que tiene lugar la calcinosis por un osteoblasto. En este sentido, los materiales representativos que constituyen una matriz extracelular incluyen, aunque no de forma limitativa, colágeno I, colágeno III, colágeno IV, colágeno V, elastina, colágeno VIII, vitronectina, fibronectina, laminina, tromboespondina, y proteoglicanos (por ejemplo, decorina, biglicano, fibromodulina, lumicano, ácido hialurónico, agregcano y similares). Se pueden utilizar diversas matrices extracelulares que tienen un papel en la adhesión celular en la presente invención.
- Como se usa en el presente documento, "laminina" es una proteína que constituye una membrana basal de una matriz extracelular. La laminina promueve multicelularidad a la construcción del tejido y el mantenimiento de la misma, la adhesión celular, la migración celular, y el crecimiento celular tienen una estrecha relación con las células cancerosas. Se considera que la laminina se va a expresar en un estadio temprano (estadio de 2 células). La laminina es un heterodímero que consiste en cada una de una cadena  $\alpha$ , una cadena  $\beta$  y una cadena  $\gamma$ . Para nombrar la laminina, se conoce la nomenclatura en el orden del descubrimiento (laminina-1, laminina-2, etc.). Sin embargo, debido a que no se considera la correspondencia con las subunidades, se emplea en el presente documento un nuevo procedimiento de denominación, en el que se describen conjuntamente el nombre de las subclases  $\alpha$ ,  $\beta$ , o  $\gamma$  (un número de tres dígitos,  $\alpha$  indica el dígito de las centenas,  $\beta$  indica el dígito de las unidades, y  $\gamma$  indica el dígito de las unidades. en el caso de  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$ , dicha laminina se denomina laminina 111. Para una laminina, se han descubierto cinco tipos de cadenas  $\alpha$ , 3 tipos de cadenas  $\beta$ , y tres tipos de cadena  $\gamma$ . Por consiguiente, el número máximo teórico de combinaciones es  $5 \times 3 \times 3 = 45$ , y son posibles 45 tipos de moléculas de laminina. Sin embargo, se cree que no todas las combinaciones existen en la naturaleza. Cada subunidad se denomina LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMA4, o LAMA5 para una cadena  $\alpha$ , LAMB1, LAMB2, o LAMB3 para una cadena  $\beta$ , y LAMC1, LAMC2, o LAMC3 para una cadena  $\gamma$ . Las proteínas lamininas usadas en la presente invención pueden ser aquellas en forma natural o aquellas en una forma modificada en las que uno o más restos de aminoácidos están modificados reteniendo a la vez la actividad biológica, especialmente, la actividad de promoción de la adhesión celular. Además, las proteínas lamininas de la presente invención no están limitadas en el origen, el procedimiento de producción de las mismas o similares, siempre que la proteína laminina tenga las características descritas en el presente documento. Por consiguiente, las proteínas lamininas usadas en la presente invención pueden ser de cualesquiera proteínas de origen natural, proteínas expresadas a partir de un ADN recombinante mediante un procedimiento de ingeniería genética, o proteínas sintetizadas químicamente. El origen de las proteínas lamininas usadas en la presente invención no está particularmente limitado, pero se derivan preferentemente de un ser humano. Cuando se cultiva una célula humana con el fin de obtener un material médico, es preferible, aunque no de forma limitativa, usar una laminina obtenida de un ser humano a fin de evitar el uso de un material obtenido de otro animal.
- Se conocen las moléculas de unión de la laminina.  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 8$  son integrinas conocidas como receptores de lamininas.

La siguiente Tabla describe las lamininas representativas y por tanto la explicación.

especificidad de unión de la integrina al sitio de expresión principal de la composición de laminina (nombre)		
$\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (laminina-1) $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ (laminina-3)	Tejido fetal	$\alpha 6\beta 1$
$\alpha 2\beta 1\gamma 1$ (laminina-2) $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ (laminina-4) $\alpha 2\beta 1\gamma 3$ (laminina-12)	Músculos, nervios (células de Schwann)	$\alpha 7\beta 1, \alpha 6\beta 1, \alpha 3\beta 1$
$\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (laminina-5) $\alpha 3\beta 1\gamma 1$ (laminina-6) $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ (laminina-7)	Piel, pulmón, y otro tejido epitelial	$\alpha 3\beta 1, \alpha 6\beta 4$
$\alpha 4\beta 1\gamma 1$ (laminina-8) $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ (laminina-9)	Vaso sanguíneo	$\alpha 6\beta 1, \alpha 3\beta 1$
$\alpha 5\beta 1\gamma 1$ (laminina-10) $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ (laminina-11)	Vaso sanguíneo, hígado, pulmón, y otro tejido epitelial	$\alpha 3\beta 1, \alpha 6\beta 1$

- Como se usa en el presente documento, "cadena  $\alpha 1$ (LAMA1)" es una subunidad de una proteína laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMA1, LAMA, S-LAM-alfa, o similares. Para LAMA1 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_005559 y NP\_005550, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 150320. cuando se usan para los fines

del presente documento, se entiende que "cadena  $\alpha$ 1" o "LAMA1" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, o un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "cadena  $\alpha$ 2(LAMA2) es una subunidad de una proteína laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMA2, LAMM, o similares. Para LAMA2 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_000426 y NP\_000417, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 156225. cuando se usan para los fines del presente documento, se entiende que "cadena  $\alpha$ 2" o "LAMA2" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, o un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "cadena  $\alpha$ 3" (LAMA3) es una subunidad de una proteína laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMA3, BM600, E170, LAMNA, LOCS, lama3a, o similares. Para LAMA3 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_000227 y NP\_000218, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 600805. cuando se usan para los fines del presente documento, se entiende que "cadena  $\alpha$ 3" o "LAMA3" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, o un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "cadena  $\alpha$ 4(LAMA4) es una subunidad de una proteína laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMA4, LAMA3, LAMA4M, CMD1JJ o similares. Para LAMA4 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_001105206 y NP\_001098676, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 600133. cuando se usan para los fines del presente documento, se entiende que "cadena  $\alpha$ 4" o "LAMA4" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, o un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "cadena  $\alpha$ 5(LAMA5) es una subunidad de una proteína laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMA5, KIAA1907, o similares. Para LAMA5 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_005560 y NP\_005551, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 601033. cuando se usan para los fines del presente documento, se entiende que "cadena  $\alpha$ 5" o "LAMA5" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, o un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "cadena  $\beta$ 1(LAMB1) es una subunidad de una proteína laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMB1, CLM, LIS5, o similares. Para LAMB1 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_002291 y NP\_002282, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 150240. cuando se usan para los fines del presente documento, se entiende que "cadena  $\beta$ 1" o "LAMB1" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, o un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "cadena  $\beta$ 2 (LAMB2) (laminina S) es una subunidad de una proteína laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMB2, LAMS, NPHS5, o similares. Para LAMB2 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_002292 y NP\_002283, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 150325. cuando se usan para los fines del presente documento, se entiende que "cadena  $\beta$ 2" o "LAMB2" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, o un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "cadena  $\beta$ 3(LAMB3) es una subunidad de una proteína laminina de una

molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMB3, BM600-125KDA, LAM5, LAMNB1, o similares. Para LAMB3 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_000228 y NP\_000219, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 150310. cuando se usan para los fines del presente documento, se entiende que "cadena  $\beta$ 3" o "LAMB3" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "cadena  $\gamma$ 1 (LAMC1) es una subunidad de una proteína laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMC1, LAMB2, o similares. Para LAMC1 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_002293 y NP\_002284, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 150290. cuando se usan para los fines del presente documento, se entiende que "cadena  $\gamma$ 1" o "LAMC1" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "cadena  $\gamma$ 2 (LAMC2) es una subunidad de una proteína laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMC2, B2T, BM600, CSF, EBR2, EBR2A, LAMB2T, LAMNB2, o similares. Para LAMC2 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_005562 y NP-005553, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 150292. cuando se usan para los fines del presente documento, se entiende que "cadena  $\gamma$ 2" o "LAMC2" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "cadena  $\gamma$ 3 (LAMC3) es una subunidad de una proteína laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMC3, OCCM, o similares. Para LAMC3 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM\_006059 y NP\_006050, respectivamente. OMIM se identifica con un número de registro 604349. cuando se usan para los fines del presente documento, se entiende que "cadena  $\gamma$ 3" o "LAMC3" significa no solo una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en el número de secuencia o el número de registro específico (o un ácido nucleico que codifica la proteína), sino también un derivado funcionalmente activo, un fragmento funcionalmente activo, un homólogo del mismo, o un mutante codificado por un ácido nucleico que se hibrida a un ácido nucleico que codifica una proteína con una condición de rigor alta o baja.

Como se usa en el presente documento, "laminina expresada en células endoteliales de la córnea" se refiere a un tipo de gen de laminina que se expresa en un estado normal, o que se expresa preferentemente de forma significativa al nivel de la proteína, en células endoteliales de la córnea.  $\alpha$ 5,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, y  $\gamma$ 1 se confirma que se expresan mediante el análisis en el presente documento (Fig 2). Por consiguiente, se confirmó al menos que la laminina 511 y la laminina 521 se expresaban en células endoteliales de la córnea. Dev.Dyn.218, 213-234, 2000, y J.Biol.Chem. 277(15), 12741-12748, 2002 tienen una descripción detallada de la laminina 511. Para la laminina 511 o similares, es posible utilizar aquellas que están comercialmente disponibles. Por ejemplo, las proteínas recombinantes de laminina 511 y laminina 521 están comercialmente disponibles y obtenibles de BioLamina AB.

Como se usa en el presente documento, la "expresión" de un gen, polinucleótido, polipéptido o similar se refiere al gen o similar que se está sometiendo a un determinado efecto *in vivo* para estar en otra forma. Preferentemente, el término se refiere a un gen, polinucleótido o similar que se transcribe y traduce para estar en la forma de un polipéptido. Sin embargo, el gen, polinucleótido o similar que se transcribe para dar como resultado un ARNm puede estar en una forma de expresión. Aún preferentemente, dicha forma de polipéptido puede ser aquella que recibe el procesamiento tras la traducción (denominada como un derivado en el presente documento). Por ejemplo, Se puede determinar mediante cualquier procedimiento el nivel de expresión de cada cadena de laminina. De manera específica, el nivel de expresión de cada cadena de laminina puede encontrarse evaluando la cantidad de ARNm de cada cadena de laminina, la cantidad de proteína de cada cadena de laminina y la actividad biológica de la proteína de cada cadena de laminina. Se puede determinar la cantidad de ARNm o proteína de cada cadena de laminina mediante un procedimiento como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "equivalente funcional" se refiere a cualquier cosa que la misma función prevista, pero una estructura diferente con respecto a la entidad sujeto original. Por consiguiente, se entiende que cuando se refiere a un "grupo que consiste en una laminina de cada cadena de laminina, o un equivalente funcional de la misma" o un "grupo que consiste en una laminina, cada cadena de laminina, y un equivalente funcional de la misma", lo siguiente está abarcado en lo anterior: una laminina o cada propia cadena de laminina, así como los fragmentos, mutantes o variantes de la laminina o cada cadena de laminina (por ejemplo, una variante de una secuencia de aminoácidos o similar) que tiene una o más capacidades de adhesión celular, regulación de la

diferenciación y/o acción de promover el crecimiento sobre una célula del ojo o similar; y las sustancias que puedan cambiar en una laminina o en cada propia cadena de laminina, o un fragmento, mutante o variante de la laminina o de cada cadena de laminina en el momento de la acción (incluyendo, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una laminina o cada propia cadena de laminina, o un fragmento, mutante o variante de laminina o cada cadena de laminina y un vector, célula o similar que comprende dicho ácido nucleico). Un ejemplo representativo del "grupo que consiste en una laminina de cada cadena de laminina, o un equivalente funcional de la misma" o un "grupo que consiste en una laminina, cada cadena de laminina y un equivalente funcional de la misma" incluye al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en la laminina y fragmentos de la misma. En la presente invención, se entiende que un equivalente funcional de una laminina o cada cadena de laminina puede usarse de forma similar a una laminina o cada cadena de laminina sin mención específica de la misma.

Como se usa en el presente documento, "fragmento" se refiere a un polipéptido o polinucleótido con una longitud de secuencia de 1 a n-1 con respecto a la longitud completa de un polipéptido o polinucleótido (longitud n). La longitud de un fragmento puede cambiarse de manera adecuada de acuerdo con el objetivo. Por ejemplo, Para un polipéptido, el límite inferior de la longitud del mismo incluye 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y más aminoácidos. Además, las longitudes representadas por un número entero que no está específicamente relacionado en el presente documento (por ejemplo, el 11 y similares) puede también ser adecuada como límite inferior. Además, para un polinucleótido, el límite inferior de la longitud del mismo incluye 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100 y más nucleótidos. Además, las longitudes representadas por un número entero que no está específicamente relacionado en el presente documento (por ejemplo, el 11 y similares) puede también ser adecuada como límite inferior. se entiende en el presente documento que los propios fragmentos de dicha cadena de laminina, cuando funcionan como un factor de actividad, por ejemplo, la promoción o el mantenimiento del crecimiento, están comprendidos en el alcance de la presente invención. De acuerdo con la presente invención, como se usa en el presente documento, el término "actividad" se refiere a una función de una molécula en el significado más amplio. La actividad abarca generalmente, aunque no se pretende que esté limitada a, la función biológica, la función bioquímica, la función física, o la función química de una molécula. la actividad abarca, por ejemplo, la actividad enzimática, la capacidad para interactuar con otra molécula y la capacidad de activar, promover, estabilizar, inhibir, suprimir, o desestabilizar una función de otra molécula, la estabilidad, y la capacidad de localizarse en una posición específica en una célula. Cuando sea aplicable, el término se dirige a una función de un complejo de proteína en el significado más amplio. Como se usa en el presente documento, la "función biológica", cuando se hace referencia a un gen o un ácido nucleico o polipéptido del anterior, se refiere a una función específica que el gen, ácido nucleico o polipéptido puede tener en un organismo vivo. "Función biológica" incluye, aunque no de forma limitativa, la creación de un anticuerpo específico, la actividad enzimática, que proporciona resistencia y similares. Como se usa en el presente documento, la función biológica puede ejercerse mediante la "actividad biológica". Como se usa en el presente documento, la "actividad biológica" se refiere a la actividad que un factor (por ejemplo, polinucleótido y proteína) puede tener en un organismo vivo, y la actividad que ejerce una variedad de funciones (por ejemplo, la actividad que promueve la transcripción) está abarcada en la misma. Por ejemplo, está abarcada también la actividad de activar o desactivar una molécula de la interacción con otra molécula. Cuando interactúan dos factores, la actividad biológica de los mismos puede pensarse como la unión de las dos moléculas y el cambio biológico resultante de las anteriores, por ejemplo, en el caso cuando se unen las dos moléculas, por ejemplo, las dos moléculas se unen si coprecipitan cuando se usa un anticuerpo contra una cualquiera de las moléculas. Por consiguiente, un procedimiento de determinación incluye observar dicha coprecipitación. Por ejemplo, cuando un factor es una enzima, la actividad biológica de la misma abarca la actividad enzimática de la misma. En otro ejemplo, cuando un factor es un ligando, está abarcada la unión a un receptor al cual se corresponde el ligando. Dicha actividad biológica puede medirse mediante una técnica bien conocida en la materia. Por consiguiente, "la actividad" se refiere a diversos indicadores medibles que indican o desvelan la unión (tanto de forma directa como indirecta) o una respuesta estimulada (es decir, que tiene un efecto medible en respuesta a alguna exposición o estimulación). Por ejemplo, "actividad" incluye un compuesto que se une a un polipéptido o polinucleótido de la presente invención, la cantidad de proteínas afectada en la dirección 5' o 3' tras alguna exposición o estimulación, o una medida de otra función análoga.

"funcionalmente activo" como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido, un fragmento o un derivado, que tiene función bioquímica, función de regulación, o función estructural de una proteína tal como actividad biológica de acuerdo con la realización asociada con el polipéptido, un fragmento o derivado, de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, un "fragmento" de una laminina se refiere a cualquier fragmento de una laminina. Como un agente usado en la presente invención, se entiende que no solo la longitud completa de una laminina, sino también un fragmento de la laminina se puede usar siempre como el fragmento que tiene la función de la longitud completa de la laminina, particularmente, la capacidad de adhesión celular de una célula endotelial. Por consiguiente, un fragmento de una laminina usado en la presente invención generalmente tiene al menos una característica de la laminina. Dicha característica puede abarcar la capacidad de adhesión celular de una célula endotelial en particular.

Se describirá a continuación la secuencia de una laminina que se encuentra que se va a expresar en las células endoteliales de la córnea en la presente invención. Se entiende que estas lamininas indican los ejemplos representativos preferidos de la presente invención y la presente invención no está limitada a estos subtipos de laminina específicos.

Una secuencia de nucleótidos representativa de la cadena de la laminina  $\alpha 5$  puede ser

- (a) un polinucleótido que tiene la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de secuencia de la misma;
- 5 (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma;
- (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido variante o un fragmento del mismo en el que uno o más aminoácidos tienen una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en una sustitución, adición y delección en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2, en la que un polipéptido variante tiene actividad biológica;
- 10 (d) un polinucleótido que es un mutante de alelo o un mutante de corte y empalme de la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma;
- (e) un polinucleótido que codifica una especie homóloga de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma;
- 15 (f) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido de uno de (a)-(e) bajo condiciones rigurosas y codifica un polipéptido que tiene actividad biológica; o
- (g) un polinucleótido que consiste en una secuencia base con una identidad de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con un polinucleótido de uno de (a) a (e) o una secuencia complementaria del mismo y codifica un polipéptido que tiene actividad biológica. En este sentido, la actividad biológica se refiere normalmente a la actividad de una cadena de laminina  $\alpha 5$ . Doi M y col., J.Biol.Chem. 277(15), 12741-12748, 2002 y la patente de Estados Unidos n.º 6.933.273 puede tomarse como referencia para las cadenas  $\alpha 5$ .
- 20

Una cadena de aminoácidos de una cadena de laminina  $\alpha 5$  puede ser

- (a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma;
- 25 (b) un polipéptido que tiene actividad biológica y uno o más aminoácidos con una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en una sustitución, adición y delección en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2;
- (c) un polipéptido codificado por un alelo mutante o un mutante de corte y empalme, de la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 1;
- 30 (d) un polipéptido que es una especie homóloga de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2; o
- (e) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con un polipéptido de uno de (a) a (d). En este sentido, la actividad biológica se refiere normalmente a la actividad de una cadena de laminina  $\alpha 5$ . Doi M y col., J. Biol. Chem. 277(15), 12741-12748, 2002 y la patente de Estados Unidos n.º 6.933.273 puede tomarse como referencia para las cadenas  $\alpha 5$ .

Una secuencia de nucleótidos representativa de la cadena de la laminina  $\beta 1$  puede ser

- 35 (a) un polinucleótido que tiene la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de secuencia de la misma;
- (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma;
- 40 (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido variante o un fragmento del mismo en el que uno o más aminoácidos tienen una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en una sustitución, adición y delección en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 4, en la que un polipéptido variante tiene actividad biológica;
- (d) un polinucleótido que es un mutante de alelo o un mutante de corte y empalme de la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma;
- 45 (e) un polinucleótido que codifica una especie homóloga de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma;
- (f) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido de uno de (a)-(e) bajo condiciones rigurosas y codifica un polipéptido que tiene actividad biológica; o
- 50 (g) un polinucleótido que consiste en una secuencia base con una identidad de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con un polinucleótido de uno de (a) a (e) o una secuencia complementaria del mismo y codifica un polipéptido que tiene actividad biológica. En este sentido, la actividad biológica se refiere normalmente a la actividad de una cadena de laminina  $\beta 1$ . Pillarainen y col., J.Biol.Chem.262(22), 10454-10462, 1987 y la patente de Estados Unidos n.º 6.933.273 puede tomarse como referencia para las cadenas  $\beta 1$ .

Una cadena de aminoácidos de una cadena de laminina  $\beta 1$  puede ser

- 55 (a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma;
- (b) un polipéptido que tiene actividad biológica y uno o más aminoácidos con una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en una sustitución, adición y delección en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 4;
- 60 (c) un polipéptido codificado por un alelo mutante o un mutante de corte y empalme, de la secuencia base descrita

en la SEQ ID NO: 3;

(d) un polipéptido que es una especie homóloga de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 4; o  
 (e) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con un polipéptido de uno de (a) a (d). Pillarainen y col., J.Biol.Chem.262(22), 10454-10462, 1987 y la patente de Estados Unidos n.º 6.933.273 puede tomarse como referencia para las cadenas β1.

Una secuencia de nucleótidos representativa de la cadena de la laminina β2 puede ser

(a) un polinucleótido que tiene la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de secuencia de la misma;

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 6 o un fragmento de la misma;

(c) un polinucleótido que codifica un polipéptido variante o un fragmento del mismo en el que uno o más aminoácidos tienen una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en una sustitución, adición y delección en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 6, en la que un polipéptido variante tiene actividad biológica;

(d) un polinucleótido que es un mutante de alelo o un mutante de corte y empalme de la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de la misma;

(e) un polinucleótido que codifica una especie homóloga de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 6 o un fragmento de la misma;

(f) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido de uno de (a)-(e) bajo condiciones rigurosas y codifica un polipéptido que tiene actividad biológica; o

(g) un polinucleótido que consiste en una secuencia base con una identidad de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con un polinucleótido de uno de (a) a (e) o una secuencia complementaria del mismo y codifica un polipéptido que tiene actividad biológica. En este sentido, la actividad biológica se refiere normalmente a la actividad de una cadena de laminina β2. Wewer UM y col., Genomics. 15 de nov, 1994; 24(2):243-52., 1987 y la patente de estados Unidos n.º 6.933.273 puede tomarse como referencia para las cadenas β2.

Una cadena de aminoácidos de una cadena de laminina β2 puede ser

(a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 6 o un fragmento de la misma;

(b) un polipéptido que tiene actividad biológica y uno o más aminoácidos con una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en una sustitución, adición y delección en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 6;

(c) un polipéptido codificado por un alelo mutante o un mutante de corte y empalme, de la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 5;

(d) un polipéptido que es una especie homóloga de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 6; o

(e) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con un polipéptido de uno de (a) a (d). En este sentido, la actividad biológica se refiere normalmente a la actividad de una cadena de laminina β2. Wewer UM y col., Genomics. 15 de nov, 1994; 24(2):243-52., 1987 y la patente de estados Unidos n.º 6.933.273 puede tomarse como referencia para las cadenas α5.

Una secuencia de nucleótidos representativa de la cadena de la laminina γ1 puede ser

(a) un polinucleótido que tiene la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 7 o un fragmento de secuencia de la misma;

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 8 o un fragmento de la misma;

(c) un polinucleótido que codifica un polipéptido variante o un fragmento del mismo en el que uno o más aminoácidos tienen una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en una sustitución, adición y delección en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 8, en la que un polipéptido variante tiene actividad biológica;

(d) un polinucleótido que es un mutante de alelo o un mutante de corte y empalme de la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 7 o un fragmento de la misma;

(e) un polinucleótido que codifica una especie homóloga de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 8 o un fragmento de la misma;

(f) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido de uno de (a)-(e) bajo condiciones rigurosas y codifica un polipéptido que tiene actividad biológica; o

(g) un polinucleótido que consiste en una secuencia base con una identidad de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con un polinucleótido de uno de (a) a (e) o una secuencia complementaria del mismo y codifica un polipéptido que tiene actividad biológica. En este sentido, la actividad biológica se refiere normalmente a la actividad de una cadena de laminina γ1. Pillarainen y col., J.Biol.Chem.263(14), 6751-6758, 1988 y la patente de Estados Unidos n.º 6.933.273 puede tomarse como referencia para las cadenas γ1.

Una cadena de aminoácidos de una cadena de laminina γ1 puede ser

(a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 8 o un fragmento de la misma;

(b) un polipéptido que tiene actividad biológica y uno o más aminoácidos con una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en una sustitución, adición y delección en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 8;

(c) un polipéptido codificado por un alelo mutante o un mutante de corte y empalme, de la secuencia base descrita en la SEQ ID NO: 7;

(d) un polipéptido que es una especie homóloga de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 8; o

(e) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con un polipéptido de uno de (a) a (d). En este sentido, la actividad biológica se refiere normalmente a la actividad de una cadena de laminina  $\gamma$ 1. Pillarainen y col., J.Biol.Chem.263(14), 6751-6758, 1988 y la patente de Estados Unidos n.º 6.933.273 puede tomarse como referencia para las cadenas  $\gamma$ 1.

Como se usa en el presente documento, "proteína", "polipéptido", "oligopéptido" y "péptido" se usan de manera indistinta con el mismo significado, y se refieren a un polímero de una secuencia de aminoácidos de cualquier longitud. Este polímero puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada, o una cadena cíclica. Los aminoácidos pueden ser naturales o no naturales, o pueden ser aminoácidos alterados. Este término puede abarcar también aquellos ensamblados en un complejo de una pluralidad de cadenas polipeptídicas. Este término abarca también un polímero de aminoácidos alterado natural o artificialmente. Dicha alteración abarca, por ejemplo, la formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra operación o alteración (por ejemplo, conjugación con un componente marcado). Esta definición abarca también, por ejemplo, un polipéptido que comprende uno o más análogos de aminoácidos (por ejemplo, que incluyen aminoácidos no naturales), compuestos análogos a péptidos (por ejemplo, peptoides) y otras alteraciones públicamente conocidas en el campo sujeto. Con respecto a la proteína de la presente invención (por ejemplo, cada cadena de laminina), un ADN que codifica cada gen de una cadena diana se incorpora en un vector adecuado, que se introduce en una célula eucariota o procariota usando un vector de expresión que se puede expresar en cualquier hospedador, y se deja que se expresa la cadena respectiva, obteniendo por tanto la proteína deseada. Las células hospedadoras que se pueden usar para expresar la laminina incluyen, sin limitación particular, células hospedadoras procariotas tales como ER. coli y bacillus subtilis, y células hospedadoras eucariotas tales como levaduras, hongos, células de insectos, plantas y células vegetales, y células de mamíferos. Los vectores construidos para expresar una cadena de laminina diana o similar se pueden introducir en la célula hospedadora anteriormente mencionada, usando una transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, una técnica de un cañón de partículas, precipitación con fosfato cálcico, el procedimiento del Agrobacterium, microinyección directa o similares. Vectores que comprenden células se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado para producir las cadenas de laminina usadas en la presente invención, y las cadenas de laminina se purifican a partir de las células o del medio de cultivo, obteniendo por tanto cadenas de laminina o similares. La purificación puede llevarse a cabo usando cromatografía de exclusión molecular, HPLC, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de inmovilización, o similares.

Como se usa en el presente documento, el "aminoácido" puede ser natural o no natural siempre que se cumpla el objetivo de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan de manera indistinta con el mismo significado, y se refieren a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud. Estos términos incluyen también "derivados de oligonucleótidos" o "derivados de polinucleótidos". El "derivado de oligonucleótido" o el derivado de polinucleótido se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido que incluye un derivado de nucleótido o en el que la unión entre nucleótidos es diferente entre la unión normal, y se usan de manera indistinta. Como para dicho oligonucleótido, lo siguiente se ilustra específicamente: 2' -O-metil-ribonucleótido; un derivado de oligonucleótido en el que la unión fosfodiéster en un oligonucleótido se convierte en una unión fosforotioato; un derivado de oligonucleótido en el que la unión fosfodiéster en un oligonucleótido se convierte en una unión de fosforamida N3'-P5'; un derivado de oligonucleótido en el que la unión de la ribosa y el fosfodiéster en un oligonucleótido se convierten en una unión de péptido y ácido nucleico; un derivado de oligonucleótido en el que el uracilo en un oligonucleótido está sustituido por propinil uracilo en C5; un derivado de oligonucleótido en el que el uracilo en un oligonucleótido está sustituido por tiazol uracilo en C5; un derivado de oligonucleótido en el que la citosina en un oligonucleótido está sustituida por una propinil citosina en C5; un derivado de oligonucleótido en el que la citosina en un oligonucleótido está sustituida por citosina modificada con fenoxazina; un derivado de oligonucleótido en el que la ribosa en el ADN está sustituida por 2'-O-propilribosa; y un derivado de oligonucleótido en el que la ribosa en un oligonucleótido está sustituida por una 2'-metoxietoxi ribosa. A menos que se indique otra cosa, se pretende que las secuencias de ácidos nucleicos específicas abarquen una variante alterada conservativamente (por ejemplo, para sustituir un codón degenerado) y una secuencia complementaria de la misma, de forma similar a las secuencias explícitamente indicadas. De manera específica, se puede conseguir un sustituto de un codón degenerado creando una secuencia en la que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos los codones) están sustituidos por una base mixta y/o un resto de desoxiinosina (Batzner y col., Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsuka y col., J. Biol. Chem. 260: 2605-2608(1985); Rossolini y col., Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994)). Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" se usa de manera indistinta con el gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido, y polinucleótido. Como se usa en el presente documento, un "nucleótido" puede ser natural o no natural.

Como se usa en el presente documento, "gen" se refiere a un agente que define un rasgo genético. Normalmente, un

gen se secuencia en un orden dado en un cromosoma. Un gen que define una estructura primaria de proteína se denomina un gen estructural, y un gen que afecta la expresión de la misma se denomina gen regulador. En el presente documento, "gen" puede referirse a "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico".

5 Los aminoácidos pueden denominarse en el presente documento mediante códigos de tres letras públicamente conocidos de los mismos, o códigos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB. De forma similar, los nucleótidos pueden denominarse mediante códigos de una letra reconocidos generalmente. En el presente documento, la comparación de la similitud, identidad y homología de las secuencias de aminoácidos y secuencias de bases se calcula con los parámetros por defecto, y con una herramienta de análisis de secuencias, BLAST. Las búsquedas de identidad se realizan con, por ejemplo, BLAST 2.2.26 (presentado el 30 de octubre de 2011) de NCBI. Los valores de identidad usados en el presente documento se refieren a los valores alineados bajo condiciones por defecto usando el BLAST. Sin embargo, si se obtienen valores mayores debidos a cambios en los parámetros, el valor más alto se definirá por ser el valor para la identidad. Si la identidad se evalúa en una pluralidad de regiones, el valor más alto en las regiones se define por ser el valor de la identidad. La similitud es un valor numérico en el que aminoácidos similares se toman en consideración para el cálculo además de la identidad.

15 Como se usa en el presente documento, "polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas" se refiere a condiciones bien conocidas comúnmente usadas en el campo sujeto. Se entiende que se puede usar también, con respecto a la laminina usada en la presente invención, que aquella codificada por "polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas" con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos de las lamininas desveladas específicamente respectivas. Con un polinucleótido seleccionado entre los polinucleótidos de la presente invención usados como una sonda, el uso de una técnica de hibridación de colonias, una técnica de hibridación de placas o una técnica de hibridación mediante transferencia southern permite obtener dicho polinucleótido. De manera específica, significa un polinucleótido obtenido llevando a cabo la hibridación a 65 °C en presencia de NaCl de 0,7 a 1,0 M usando un filtro al cual se inmoviliza un ADN derivado de colonia o placa, y a continuación lavando el filtro en la condición de 65 °C con una solución SSC (solución salina-citrato de sodio) a una concentración de 0,1 a 2 veces (en la que la composición de la solución SSC de una concentración fría es cloruro de sodio 150 mM y citrato de sodio 15 mM). La hibridación puede llevarse a cabo de acuerdo con los procedimientos descritos en los documentos experimentales tales como Molecular Cloning 2ª ed., Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1-38, DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Segunda Edición, Oxford University Press (1995). Aquí, las secuencias que comprenden solo una secuencia A o una secuencia T se excluyen preferentemente de las secuencias que se hibridan en condiciones rigurosas. Por lo tanto, los polipéptidos (por ejemplo, transtirretina) utilizados en la presente invención abarcan también un polipéptido codificado por una molécula que se hibrida en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido específicamente descrito en la presente invención. Estas condiciones de rigor bajo incluyen llevar a cabo la hibridación durante 18 a 20 horas a 40 °C en un tampón que comprende formamida al 35 %, 5xSSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02 %, BSA al 0,02 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y sulfato de dextrano al 10 % (peso/volumen); lavando 1 a 5 horas a 55 °C en un tampón que consiste en 2xSSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5mM, y SDS al 0,1 %; y lavando durante 1,5 horas a 60 °C en un tampón que consiste en 2xSSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1 %.

40 Como para los equivalentes funcionales de la presente invención, se pueden usar aquellos en los que se insertan, sustituyen o eliminan uno o una pluralidad de aminoácidos, o se añaden a uno o ambos extremos en una secuencia de aminoácidos. En el presente documento, "uno o una pluralidad de aminoácidos se insertan, sustituyen o eliminan, o se añaden a uno o ambos extremos en una secuencia de aminoácidos" significa que la alteración se realiza mediante sustitución o similar de una pluralidad de aminoácidos que podría producirse naturalmente, mediante un procedimiento técnico bien conocido tal como mutagénesis dirigida a sitio, o mutación de origen natural.

45 Las secuencias de aminoácidos alteradas tales como cada cadena de laminina utilizada en la presente invención pueden ser aquellas en que, por ejemplo, 1 a 30, preferentemente de 1 a 20, más preferentemente 1 a 9, de forma aún más preferente 1 a 5, de forma particularmente preferente 1 a 2 aminoácidos se insertan, sustituyen, o eliminan, o añaden a uno o ambos extremos de los mismos. Las secuencias de aminoácidos alteradas pueden ser preferentemente dichas secuencias de aminoácidos que tienen una o una pluralidad (preferentemente, 1 o varias, o 1, 2, 3, o 4) sustituciones conservativas en la secuencia de aminoácidos de cada cadena o similar de laminina. En el presente documento, "sustitución conservativa" significa sustituir uno o una pluralidad de restos de aminoácidos con diferentes restos de aminoácidos químicamente similares de tal manera que no se alteren sustancialmente las funciones de la proteína. Por ejemplo, dichos casos pueden mencionarse cuando un resto hidrófobo dado se sustituye con otro resto hidrófobo, o cuando un resto polar dado se sustituye con otro resto polar que tiene la misma carga eléctrica. Los aminoácidos funcionalmente similares capaces de realizar dicha sustitución se conocen públicamente en el campo sujeto de cada aminoácido. Los ejemplos específicos de aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, triptófano, fenilalanina, metionina y similares. Los ejemplos específicos de aminoácidos polares (neutros) incluyen glicina, serina, treonina, tirosina, glutamina, asparagina, cisteína y similares. Los ejemplos específicos de aminoácidos (básicos) que tienen una carga eléctrica positiva incluyen arginina, histidina, lisina y similares. Además, los ejemplos específicos de aminoácidos (ácidos) que tienen una carga eléctrica negativa incluyen asparagina ácida, ácido glutámico y similares.

60 Como se usa en el presente documento, "agente" puede ser, en un sentido amplio, cualquier sustancia o cualesquiera otros elementos (por ejemplo, energía tal como luz, radioactividad, calor y electricidad) siempre que la sustancia pueda

usarse de forma intercambiable y pueda conseguir un objetivo previsto. Dichas sustancias incluyen, sin limitación, por ejemplo, una proteína, polipéptido, oligopéptido, péptido, polinucleótido, oligonucleótido, nucleótido, ácido nucleico (incluyendo, por ejemplo, ADN tal como ADN genómico y ADNc, ARN tal como ARNm), polisacáridos, oligosacáridos, lípidos, moléculas orgánicas con un bajo peso molecular (por ejemplo, hormonas, un ligando, un mensajero, moléculas orgánicas con un bajo peso molecular, moléculas sintetizadas mediante química combinatoria, molécula de bajo peso molecular que se puede utilizar como un medicamento (por ejemplo, un ligando de bajo peso molecular) y similares), y moléculas complejas de los mismos. Los agentes específicos de polinucleótidos incluyen normalmente, sin limitación, polinucleótidos que tienen complementariedad con una homología de secuencias dada para una secuencia del polinucleótido anteriormente mencionado (por ejemplo, 70 % o más de identidad de secuencias), un polipéptido análogo a un factor de transcripción que se une a una región promotora, y similares. Los agentes específicos de polipéptidos incluyen normalmente, sin limitación, un anticuerpo dirigido específicamente al polipéptido, o un derivado del mismo o un análogo del mismo (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario), un ligando o receptor específico en un caso cuando el polipéptido es un receptor o un ligando, una matriz del mismo en un caso cuando el polipéptido es una enzima, y similares.

Como se usa en el presente documento, "cultivo" se refiere a células del sujeto en crecimiento, y en un sentido limitado, se refiere a un estado donde se mantiene la condición de las células sujeto, que podría de otra manera empeorar (por ejemplo, cuando el número de células no disminuirá sustancialmente). En un sentido limitado, el término se usa para tener el mismo significado que el mantenimiento del cultivo o el mantenimiento.

Como se usa en el presente documento, "crecimiento" se refiere a un estado donde el número de células aumenta.

Como se usa en el presente documento, "capacidad de crecimiento" se refiere a la capacidad de las células de crecer. A menos que se indique específicamente en el presente documento, un estado de crecimiento se refiere a la posibilidad de crecer en un estado estacionario. El "estado estacionario" se refiere a una condición normal para un organismo donde se mantiene la homeostasia del organismo vivo. Dicho estado puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia. Por ejemplo, lo mencionado se puede confirmar mediante el análisis de la densidad celular, donde la densidad celular es casi constante sin cambio, o se reconoce la expresión de un marcador del crecimiento celular, o similar. Como se usa en el presente documento, "promoción del crecimiento" se refiere a un estado de crecimiento de una célula dada. Si una célula diana no creció al principio, el inicio de incluso un pequeño crecimiento correspondería a la promoción del crecimiento. Si una célula ya estaba creciendo y el nivel del crecimiento se mantuvo o se aumentó, y preferentemente aumentó, entonces esto correspondería a la promoción del crecimiento.

Como se usa en el presente documento, "citoblasto" se refiere a una célula que tiene la capacidad de diferenciarse en una pluralidad de sistemas de células (potencial multilínea) y una capacidad de mantener el potencial multilínea incluso después de la división celular (capacidad de autorenovación). Los citoblastos incluyen embriocitoblastos, células germinales, células IPS, citoblastos tisulares y similares. Las células endoteliales de la córnea que son el objetivo de la presente invención pueden ser células tales que se diferencian de citoblastos. La diferenciación de citoblastos en células endoteliales de la córnea puede conseguirse usando procedimientos públicamente conocidos en el campo sujeto.

Como se usa en el presente documento, "función celular normal" de la célula se refiere a una función que una célula posee originalmente cuando se trata de una célula específica tal como células endoteliales de la córnea. Con respecto a la célula endotelial de la córnea, dicha función incluye, sin limitación, ZO-1 y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, capacidad adaptativa al trasplante de córnea (Matsubara M, Tanishima T: Wound-healing of the corneal endothelium in the monkey: a morphometric study, Jpn J Ophthalmol 1982, 26:264-273;

Matsubara M, Tanishima T: Wound-healing of corneal endothelium in monkey: an autoradiographic study, Jpn J Ophthalmol 1983, 27:444-450; Van Horn DL, Hyndiuk RA: Endothelial wound repair in primate cornea, Exp Eye Res 1975, 21:113-124 y Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ: Regenerative capability of the corneal endothelium in rabbit and cat, Invest Ophthalmol Vis Sci 1977, 16:597-613), y similares.

ZO-1 y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa puede evaluarse observando la expresión de las proteínas por medios inmunitarios o a un nivel del ARNm tal como la RT-PCR. La confirmación de la expresión y/o la función de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa y ZO-1 al mismo nivel que permite la confirmación de las células normales en cuanto a si las células sujetos tienen o no una función normal.

Como para la capacidad de adaptación al trasplante de córnea, se pueden llevar a cabo ensayos de implante de las células cultivadas mediante curetaje mecánico del endotelio de córnea como un modelo de queratopatía bullosa con animales experimentales tales como conejos. Sin embargo, debido a que las células endoteliales de la córnea de conejos crecen *in vivo*, no es posible negar la posibilidad de la cicatrización natural debido al crecimiento de las células endoteliales de la córnea de los hospedadores (Matsubara M, y col., Jpn J Ophthalmol 1982, 26:264-273; Matsubara M, y col., Jpn J Ophthalmol 1983, 27:444-450; Van Horn DL, y col., Exp Eye Res 1975, 21:113-124 y Van Horn DL, y col., Invest Ophthalmol Vis Sci 1977, 16:597-613). Por lo tanto, a fin de evaluar de forma más precisa la capacidad adaptativa al trasplante, es preferible evaluar el injerto en primates. Cuando se evaluó la capacidad adaptativa al trasplante en seres humanos, se evaluó la adaptabilidad en primates, tal como los monos comedores de cangrejos, después de al menos un mes, preferentemente al menos dos meses, más preferentemente al menos tres meses, aún

de forma más preferente al menos seis meses, y además, aún más preferentemente al menos doce meses, por ejemplo. La confirmación de la capacidad adaptativa al trasplante en primates tales como monos son importante en la aplicación a seres humanos, en particular.

5 Como se usa en el presente documento, "BrdU" es una abreviatura de bromodesoxiuridina. Debido a que BrdU se incorpora como un análogo de dTTP en la síntesis del ADN, el ADN (del núcleo de la célula) en el que se incorpora el BrdU puede detectarse mediante un anticuerpo específico para BrdU que se incorpora en el ADN. Por consiguiente, BrdU se utiliza como un índice para mostrar una alta capacidad de crecimiento/capacidad de diferenciación.

Como se usa en el presente documento, "positivo para BrdU" se refiere a un estado donde un marcador celular, BrdU, se expresa en una célula diana.

10 Como se usa en el presente documento, "cultivos" se refiere a aquellos producidos cultivando células tales como el endotelio de córnea. Por consiguiente, "cultivos del endotelio de córnea" se refiere a los cultivos del endotelio de córnea, y la expresión se refiere normalmente a aquellos presentes en un estado diferente de los presentes *in vivo*. Los cultivos del endotelio de córnea obtenidos mediante procedimientos convencionales fueron problemáticos porque dichos cultivos tenían una capacidad de crecimiento baja y podrían llegar a transformarse fácilmente y perder las funciones (Peh GS, Beuerman RW, Colman A, Tan DT, Mehta JS (2011) Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: an overview. Transplantation 91: 811-819., Okumura N, Kay E, Nakahara M, Hamuro J, Kinoshita S, y col. (2013) Inhibition of TGF- $\beta$  signaling enables human corneal endothelial cell expansion *in vitro* for use in regenerative medicine. PLoS One 8:e58000.). Por lo tanto, desde el punto de vista de los cultivos, dicha densidad celular podría no conseguirse para aquellos que se cultivaron durante un periodo de tiempo particularmente largo o aquellos que se subcultivaron. De manera específica, la densidad de las células endoteliales de la córnea disminuye fácilmente a lo largo del cultivo. La densidad endotelial de la córnea es uno de los índices más clínicamente importantes para el grado de salud. Por consiguiente, el cultivo a una alta densidad es importante desde el punto de vista de la medicina de regeneración. Además, es posible aumentar la densidad endotelial por adelantado y a continuación llevar a cabo la administración *in vivo*, que puede ser un agente terapéutico extremadamente importante.

15 20 25 En este sentido, Es un hecho importante que la densidad celular que se disminuyó mediante un procedimiento de cultivo normal puede ahora aumentarse. El nivel normal del endotelio de córnea *in vivo* está comprendido en el intervalo de aproximadamente 2500-3000/mm<sup>2</sup>. La presente invención es ventajosa ya que la presente invención ha proporcionado una técnica para llevar la densidad celular de los cultivos al nivel anteriormente mencionado o para exceder el nivel.

30 Como se usa en el presente documento, "medio" se refiere a cualquier medio capaz de cultivar o hacer crecer las células endoteliales de la córnea, y el medio puede tomar cualquier forma, tal como medio líquido (medio de cultivo), medio de suspensión y medio sólido, según surja la necesidad y según sea adecuado. Los componentes para el medio usado para dichas células endoteliales de la córnea incluyen, por ejemplo, DMEM (GIBCO BRL), OptiMEM (Life Technologies), suero (por ejemplo, suero de feto de bovino (FBS), suero humano), factor de proliferación/factor de crecimiento (por ejemplo, b-FGF), sustancia antibiótica (por ejemplo, penicilina, estreptomina, gentamicina) y similares.

40 Como se usa en el presente documento, "(cultivo) recipiente" se refiere a un recipiente para cultivar células endoteliales de la córnea. El tipo de recipientes de cultivo no está particularmente limitado, y se puede usar cualquier recipiente que se esteriliza para evitar la contaminación mediante bacterias y que son de cualquier material y de cualquier forma adecuada para cultivar células. Los ejemplos de dichos recipientes de cultivo incluyen, sin limitación, placas de cultivo, matraces de cultivo, cuencos de cultivo, placas de cultivo tales como de 96 pocillos, de 48 pocillos, de 12 pocillos, de 6 pocillos y de 4 pocillos, frascos de cultivo, usados generalmente en el campo sujeto.

(Técnicas generales)

45 La técnica de la biología molecular, la técnica bioquímica, los procesos microbiológicos usados en el presente documento son bien conocidos y se usan comúnmente en el campo sujeto, que se describe en, por ejemplo, Sambrook J. y col.(1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor y su 3<sup>a</sup> Ed.(2001); Ausubel, F. M.(1987).Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M.(1989). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience;

50 Innis, M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995).Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. y col. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, y las actualizaciones anuales; Sninsky, J. J. y col. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press, Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. y col. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. y col. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn,

5 G. M. y col.(1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press, y Bessatsu Jikken Igaku "Idenshi Dounyu & Hatsugen Kaiseki Jikken Hou" Yodosha Co., Ltd., 1997. Con respecto a las células endoteliales de la córnea, el informe de Nancy Joyce y col., {Joyce, 2004 n.º 161} {Joyce, 2003 n.º.7} es bien conocido; sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la transformación de los fibroblastos es debida a un cultivo o subcultivo a largo plazo. Por consiguiente, los estudios de procedimientos de cultivo eficaces continúan aún actualmente.

### **[Descripción de las realizaciones]**

10 Se describirá a continuación la descripción de las realizaciones preferidas. Sin embargo, debe entenderse que las realizaciones son ejemplos de la presente invención y el alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones. Además, debe entenderse que los expertos en la materia pueden practicar fácilmente la modificación, alteración o similar comprendida en el alcance de la presente invención aunque en referencia a las siguientes realizaciones preferidas. Además, debe entenderse que cualquier realización puede combinarse.

15 En un aspecto, La presente invención proporciona el uso de un agente seleccionado entre el grupo que consiste en la laminina 511, laminina 521 o un fragmento de laminina 511-E8, que se expresa en células endoteliales de la córnea, en un procedimiento para promover el crecimiento de las células endoteliales de la córnea.

En una realización, las lamininas comprenden laminina 511 (alfa5 beta1 gamma1) y laminina 521 (alfa5 beta2 gamma 1).

En una realización, el fragmento de laminina tiene capacidad de adhesión celular de las células endoteliales de la córnea.

20 En una realización, las células endoteliales de la córnea son de ser humano.

En una realización, el agente está presente en un medio.

En una realización, el agente se reviste sobre un recipiente de cultivo.

25 Aunque un agente (laminina o similar) de la presente invención puede incluirse en un medio de cultivo para su uso, el agente puede revestirse sobre (o puede cubrir) una placa de cultivo para su uso. A fin de llevar a cabo un cultivo primario y/o un subcultivo de una célula diana, un medio adecuado (por ejemplo, se usa DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) u OptiMEM) y las células, que se recogen y separan, se siembran para el cultivo primario y se subcultivan en una placa de cultivo para el cultivo. En la presente invención, se puede obtener un buen resultado de crecimiento incluso con una cantidad de suero añadida a un medio que sea un 10 % menos. Asimismo, en la presente invención, además de una laminina o además de un revestimiento de una laminina, se puede añadir una citoquina (por ejemplo, un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)) a un medio como un aditivo. Un agente de la presente invención es útil en una célula aislada como se describe en los Ejemplos y en una célula endotelial inducida a partir de células iPS o ES. Además, se entiende que dicho agente es eficaz para la propia inducción.

35 La concentración de una laminina que se usa incluye, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 500 µg/ml en una solución de medio de cultivo (por ejemplo, PBS). Para el revestimiento, una cantidad de aproximadamente 0,75 µg/cm<sup>2</sup> por unidad de área (por ejemplo, cm<sup>2</sup>) puede usarse para el revestimiento. para su uso en el tratamiento de un recipiente de cultivo, la cantidad de lamininas de la presente invención o los fragmentos de las mismas no está particularmente limitada. Se puede obtener un resultado favorable cuando se trata con una solución de laminina o fragmentos de la misma, preferentemente en la cantidad de aproximadamente 0,01 µg/ml o más, preferentemente aproximadamente 0,01 a 10 µg/ml, de forma aún más preferente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 µg/ml. aproximadamente 0,01 a 10 µg/ml o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 µg/ml de laminina o fragmentos de la misma corresponde a aproximadamente 0,0015 a 1,5 µg/cm<sup>2</sup> o aproximadamente 0,0015 a 0,3 µg/cm<sup>2</sup> como una cantidad de laminina o fragmentos de la misma en una fase sólida por área de un recipiente de cultivo.

40 En una realización preferida, la laminina incluye laminina 511 y laminina 521. Por consiguiente, En la presente realización, un agente de la presente invención puede ser laminina 511, laminina 521 o un fragmento de laminina 511-E8 de la misma.

45 Se puede usar cualquier fragmento como un fragmento de laminina 511 de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas de la presente invención, siempre que el fragmento se pueda usar en el cultivo (se puede denominar "mantenimiento" o "cultivo de mantenimiento en el presente documento, pero se usa con el mismo significado que cultivo) o crecimiento de células endoteliales de la córnea. Dicho fragmento es un fragmento de laminina 511-E8 o un fragmento de laminina 521 (el último no forma parte de la presente invención) (respectivamente, los números de secuencia 9, 10 (secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos) y los números de secuencia 11, 12 (secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos)) (véase Taniguchi Y, Ido H, Sanzen N, Hayashi M, Sato-Nishiuchi R, Futaki S, Sekiguchi K. The C-terminal region of laminin beta chains modulates the integrin binding affinities of laminins. J Biol Chem. 284:7820-7831, 2009. Disponible de Nippi, Incorporated). Un fragmento de laminina 511-E8 y un fragmento de laminina 521 son fragmentos obtenidos por el tratamiento con elastasa y están comprendidos por una porción de un

dominio de doble espiral y tres dominios LG (LG1 a LG3) en la región del extremo C de la cadena  $\alpha$  de un heterotrímero. Un fragmento E8 se considera como correspondiente a un sitio de unión a integrina de una molécula de heterotrímero en la que la cadena  $\alpha$ , la cadena  $\beta$  y la cadena  $\gamma$  de una laminina se ensamblan entre sí mediante un dominio de doble espiral. Por consiguiente, como fragmentos preferidos, se pueden usar aquellos en los que está sustancialmente retenido un sitio de unión a integrina en la longitud completa de la laminina. Se entiende que dicho fragmento puede prepararse mediante una alteración adecuada basada en la información sobre los fragmentos de laminina 511-E8 y los fragmentos de laminina 521.

En este sentido, un fragmento E8 de la laminina  $\alpha 5\beta 1\gamma 1$  humana (denominada también "laminina 511-E8 humana" en el presente documento) significa un fragmento de laminina  $\alpha 5\beta 1\gamma 1$  humana (denominada también "laminina 511 humana" en el presente documento) que corresponde a un fragmento E8 de laminina  $\alpha 1\beta 1\gamma 1$  de murino (denominada también laminina 111-E8 de murino" en el presente documento). Un fragmento E8 de una laminina se ha identificado como un fragmento con una fuerte actividad de adhesión celular entre los fragmentos que se obtienen digiriendo la laminina  $\alpha 1\beta 1\gamma 1$  de murino (descrita, a partir de ahora en el presente documento como "laminina 111 de murino") con elastasa (Edgar D., Timpl R., Thoenen H. The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J.*, 3:1463-1468, 1984., Goodman SL., Deutzmann R., von der Mark K. Two distinct cell-binding domains in laminin can independently promote nonneuronal cell adhesion and spreading. *J. Cell Biol.*, 105: 589-598, 1987.). Para la laminina 511 humana y la laminina 332 humana, se presume la presencia de un fragmento que corresponde a la laminina 111-E8 de murino tras la digestión con elastasa. La laminina 511-E8 humana usada en la presente invención no se requiere que sea un producto de digestión de la elastasa de la laminina 511 humana. La laminina 511-E8 humana usada en la presente invención puede ser un fragmento de una laminina 511 humana que tiene una actividad de adhesión celular similar, estructura similar, y aproximadamente el mismo peso molecular que la laminina 111-E8 de murino. El procedimiento para fabricar laminina 511-E8 humana no está particularmente limitado. Por ejemplo, dicho procedimiento incluye un procedimiento para permitir la digestión de la longitud completa de la laminina 511 humana mediante una enzima proteolítica tal como elastasa para fraccionar y purificar un fragmento diana, un procedimiento para fabricar una proteína recombinante y similares. Se prefiere fabricar una proteína recombinante desde el punto de vista de la cantidad de fabricación, la uniformidad de la calidad, el coste de fabricación y similares. Se puede fabricar la laminina 511-E8 humana recombinante usando de forma adecuada una técnica de recombinación génica adecuada. El procedimiento de fabricar laminina 511-E8 humana recombinante, por ejemplo, puede fabricar laminina 511-E8 humana recombinante obteniendo ADN que codifica la proteína de cada cadena  $\alpha$ , cadena  $\beta$  y cadena  $\gamma$  de la laminina 511-E8 humana, insertando cada ADN obtenido en un vector de expresión, expresando los tres tipos de vectores de expresión resultantes mediante cotransfección en las células hospedadoras adecuadas, y purificando las proteínas triméricas mediante un procedimiento conocido (por ejemplo, véase Hiroyuki Ido, y col, "The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin  $\gamma$  chains in integrin binding by laminins" *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 11144-11154, 2007.). JP 2011-78370 puede referirse a un procedimiento específico para la fabricación. Se pueden producir fragmentos similares usando laminina 521 humana, que se denomina "fragmento 521-E8 de laminina". Se entiende que dicho fragmento puede producirse de una manera similar que la laminina 511-E8, y que el mismo retiene una actividad similar a la de la laminina 511-E8.

El agente es laminina 511, laminina 521 o un fragmento de laminina 511-E8.

En una realización preferida, las células endoteliales de la córnea son de ser humano.

Las células endoteliales dirigidas por la presente invención pueden prepararse a partir de una córnea exfoliada retirando el endotelio de córnea natural de un donante de córnea sin perjudicar la integridad de la membrana de Descemet y la estructura y función de una capa estromal (por ejemplo, documento WO 2005/038015). Se puede usar una córnea exfoliada para cultivar células endoteliales de la córnea humana.

Se desvela también un recipiente de cultivo para células endoteliales de la córnea, revestido con un agente o de acuerdo con la presente divulgación.

La preparación de un recipiente cubierto o una placa de cultivo de una laminina o similar para cultivar células endoteliales de la córnea puede llevarse a cabo en referencia a un procedimiento conocido en la técnica. La preparación (revestimiento) de un recipiente de cultivo puede llevarse a cabo del siguiente modo: Por ejemplo, tras diluir una solución de laminina con tampón fosfato a 20  $\mu\text{g/ml}$  se añadió a una placa de cultivo y se incubó durante dos horas a 37  $^{\circ}\text{C}$  (5 %  $\text{CO}_2$ ), la solución puede retirarse y lavarse dos veces cada una con el tampón fosfato en un medio para su uso.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente divulgación está relacionada con una composición para revestir en fase sólida (revestimiento) un recipiente de cultivo celular para cultivar una célula en células endoteliales de la córnea con un sistema que comprende al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en las lamininas expresadas en células endoteliales de la córnea o un fragmento de las mismas (por ejemplo, laminina 511, laminina 521 o un fragmento de las mismas, o un agente para revestir en fase sólida (revestimiento) un recipiente de cultivo celular. En un aspecto, una composición o un agente de la presente divulgación es una composición de revestimiento o un agente de revestimiento. Se conoce en la materia un tratamiento técnico de lamininas en fase sólida sobre la superficie de un recipiente de cultivo. Por consiguiente, los expertos en la materia pueden usar cualquier recipiente de cultivo de

acuerdo con el objetivo de la presente invención y aplicar un tratamiento al recipiente de acuerdo con la presente invención.

5 En otro aspecto, la presente divulgación está relacionada además con un kit que comprende la composición o agente anteriormente descrito. Un kit de la presente divulgación puede comprender además un medio de cultivo celular, un recipiente de cultivo celular o similares. un recipiente de cultivo celular puede ser, por ejemplo, una placa de cultivo prerrecubierta o una placa de cultivo prerrevestida. Alternativamente, un recipiente de cultivo celular de un kit puede estar en un estado en que al menos un agente seleccionado entre un grupo que consiste en lamininas expresadas en células endoteliales de la córnea o unos fragmentos de las mismas (por ejemplo, laminina 511, laminina 521 o un fragmento de las mismas) está en una fase sólida. Un recipiente de cultivo celular, una composición, un agente, y el  
10 kit de la presente divulgación se pueden usar en un procedimiento para cultivar una célula de mamífero en un sistema que comprende al menos un factor seleccionado entre un grupo que consiste en lamininas expresadas en células endoteliales de la córnea o un fragmento de las mismas (por ejemplo, laminina 511, laminina 521 o un fragmento de las mismas).

(Procedimiento para cultivar una célula endotelial de la córnea)

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para cultivar células endoteliales de la córnea, que utiliza una composición de la presente invención. Es decir, la presente invención proporciona un procedimiento para cultivar o hacer crecer células endoteliales de la córnea, que comprende la etapa de cultivar células endoteliales de la córnea usando un agente (laminina, un fragmento de la misma o similares) de la presente invención. Un agente (laminina, un fragmento de la misma, o similares) usado en un procedimiento de la presente invención se entiende  
20 que es capaz de usar cualquier forma descrita en el presente documento. Además, cualquier componente del cultivo se puede usar en un procedimiento de la presente invención siempre que el componente se pueda usar en el cultivo del endotelio de córnea, y se puede ilustrar un componente del cultivo de cualquier forma descrita en el presente documento.

25 En una realización, las células endoteliales de la córnea cultivadas en la presente invención son de primates. En una realización preferida, las células endoteliales de la córnea cultivadas en la presente invención son de un ser humano.

En una realización preferida, el cultivo de células diana mediante un procedimiento de la presente invención es para prevenir o tratar un trastorno endotelial de la córnea, y se puede usar concretamente para producir células, tejidos o similares para un trasplante.

30 Las condiciones de temperatura tras el cultivo de células endoteliales de la córnea no están particularmente limitadas en la medida en que crezcan células endoteliales de la córnea. Sin embargo, por ejemplo, la condición de temperatura es aproximadamente de 25 °C a aproximadamente 45 °C, o preferentemente aproximadamente de 30 °C a aproximadamente 40 °C considerando la eficacia del crecimiento, o preferentemente aún de aproximadamente 37 °C. Se lleva a cabo el procedimiento de cultivo en una estufa incubadora de células común en un entorno humidificado con una concentración de CO<sub>2</sub> de aproximadamente 5 a 10 %.

35 Cualquier componente que se pueda usar en el cultivo de un endotelio de córnea se puede usar como un componente del cultivo que se puede usar en la presente invención. Además, el componente del cultivo puede ser un componente del medio que se ha adquirido y usado convencionalmente o un componente desarrollado por separados para el endotelio de córnea. Los ejemplos de dicho componente del medio incluyen, aunque no de forma limitativa OptiMEM, DMEM, M199, MEM y similares (están disponibles de INVITROGEN o similares).

40 La presente invención se caracteriza por una actividad elevada de una variedad de lamininas específicas o fragmentos de las mismas utilizando un polipéptido y/o un péptido específico en un sistema de cultivo de células que comprende un agente (por ejemplo, laminina específica o un fragmento de la misma) de la presente invención en el cultivo de células. El polipéptido se selecciona entre el grupo que consiste en proteínas de la sangre diferentes de una proteína de matriz extracelular, que es suero, albúmina de suero, prealbúmina, inmunoglobulina,  $\alpha$ -globulina,  $\beta$ -globulina,  $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT), haptoglobina (Hp),  $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-M), a-fetoproteína (AFP), transferrina, proteína de unión a retinol (RBP) o adiponectina, y gelatina, proteína de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), y peptona. En  
45 una realización de la presente invención, un polipéptido y/o un péptido que se puede usar como un componente adicional es, aunque no de forma limitativa, albúmina de suero, proteína de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) o peptona, o el polipéptido y/o el péptido es inmunoglobulina o gelatina.

50 En la presente invención, preferentemente una proteína de la sangre y preferentemente aún una proteína de la sangre diferente de una proteína de la matriz extracelular se puede usar con un agente (laminina específica o un fragmento de la misma) de la presente invención. La proteína de la sangre se selecciona preferentemente entre suero, albúmina de suero, prealbúmina, inmunoglobulina,  $\alpha$ -globulina,  $\beta$ -globulina,  $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT), haptoglobina (Hp),  $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-M), a-fetoproteína (AFP), transferrina, proteína de unión a retinol (RBP) o adiponectina, que son  
55 todas proteínas de la sangre diferentes de una proteína de matriz extracelular. "Matriz extracelular" es una sustancia que rellena el espacio extracelular. Al mismo tiempo, la matriz extracelular tiene un papel esquelético (por ejemplo, cartílago o hueso de un animal), un papel de almacén en la adhesión celular (por ejemplo, membrana basal o fibronectina), un papel en retener o proporcionar un factor de crecimiento celular o similar (por ejemplo, factor de

crecimiento celular FGF que se une al sulfato de heparán) y similar. Muchas de las células individuales que constituyen un organismo multicelular que se reconocen como vivas están enterradas en una cama o nido de una matriz extracelular. Los componentes principales de una matriz extracelular de un vertebrado, incluyendo seres humanos son glicoproteínas tales como colágeno, proteoglicanos, fibroectina, y laminina (parcialmente, moléculas de adhesión celular). "Proteína de matriz extracelular" significa una proteína que constituye dicha matriz extracelular.

"Proteínas de la sangre diferentes que una proteína de matriz extracelular" en la presente invención significa proteínas de la sangre diferentes de una proteína de matriz extracelular implicada en la adhesión celular o similar. Son todas proteínas conocidas que los expertos en la materia pueden obtener adecuadamente. Las proteínas de la sangre diferentes de una proteína de matriz extracelular son preferentemente, aunque no de forma limitativa, albúmina de suero humano (HSA/disponible por ejemplo de Nacalai Tesque), albúmina de suero humano recombinante (rHSA/ por ejemplo, disponible de SIGMA-AIDRICH), o albúmina de suero de bovino (BSA/ por ejemplo, disponible de SIGMA-AIDRICH). Además, "proteínas de la sangre diferentes de una proteína de matriz extracelular" pueden ser inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas, incluyendo IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, son bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, una inmunoglobulina humana (IgG/ por ejemplo, disponible de Oriental Yeast Col, Ltd.) se puede usar sin limitarse a lo anterior.

La "gelatina" referida en el presente documento es una sustancia extraída añadiendo calor al colágeno, que es el principal componente del tejido conectivo tal como la piel, huesos, o tendones de un animal. El principal componente de la gelatina es proteína.

Como un componente adicional, se puede usar en el presente documento una proteína de la familia del factor de necrosis tumoral. El "Factor de necrosis tumoral, TNF" es un tipo de citoquina. Estrechamente definidos, existen tres tipos de TNF, es decir, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  (linfotóxina (LT)- $\alpha$ ) y LT- $\beta$ . "Proteínas de la familia TNF" incluye al menos 19 tipos de moléculas tales como un ligando activador del receptor de NF $\kappa$ B (RANKL), el ligando Fas y el ligando CD40. Preferentemente, se puede usar un ligando activador del receptor de NF $\kappa$ B (RANKL, sRANKL) como un ejemplo de una proteína de la familia TNF usada como un componente adicional usado en la presente invención.

En la presente invención, se puede utilizar una peptona como un componente adicional. "Peptona" es una proteína obtenida disolviendo una proteína con una enzima proteolítica. La proteína es digerida por pepsina en el estómago en una peptona *in vivo*, y la peptona resultante se digiere además en aminoácidos por el jugo pancreático secretado por el páncreas y por el jugo intestinal secretado por el yeyuno. Debido a que la peptona es adecuada como fuente nutritiva de microorganismos, se añade a menudo al medio. Una peptona como la mencionada fuente nutritiva de un medio se obtiene hidrolizando una proteína en aminoácidos y un péptido de bajo peso molecular. En general, se usa comúnmente una peptona obtenida de una proteína láctea (caseína láctea) experimenta enzimolisis (utilizando una proteasa tal como pancreatina extraída del páncreas de un suínido). Se usa preferentemente una peptona derivada de una planta, pero no se limita a lo anterior. Por ejemplo, se selecciona una peptona entre el grupo que consiste en una peptona derivada de semillas de algodón, una peptona derivada de soja, una peptona derivada de trigo, y un péptido derivado de guisantes.

(Células endoteliales de la córnea y Formulación del endotelio de córnea) La presente divulgación proporciona células endoteliales de la córnea cultivadas y producidas mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención. La presente invención se puede considerar que tiene características que no existen en las células convencionales en que normalmente se obtienen células cultivadas o en crecimiento incluso cuando se lleva a cabo el cultivo normal y también cuando se lleva a cabo el subcultivo. Además, la característica más importante es que las células tienen características de células endoteliales de la córnea que son normales en sus funciones. En consecuencia, las células endoteliales de la córnea que la presente divulgación proporciona puede proporcionarse como una formulación, lo que significa que la presente divulgación proporciona una divulgación del endotelio de córnea. En consecuencia, la presente divulgación proporciona un procedimiento para fabricar una formulación del endotelio de córnea, que comprende la etapa de cultivar células endoteliales de la córnea usando una solución de cultivo que comprende el agente o la composición de acuerdo con la presente divulgación o un recipiente en el que se reviste el agente o la composición de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto, la formulación de endotelio de córnea de acuerdo con la presente divulgación contiene un material base, y una capa de células endoteliales de la córnea sobre el material base.

El material base usado en la presente divulgación no está particularmente limitado siempre que soporte una capa de células endoteliales de la córnea cultivada y mantenga su forma *in vivo* durante un periodo de tiempo dado, preferentemente al menos tres días, tras el trasplante. Además, el material base usado en la presente divulgación puede ser aquél que tiene un papel de armazón en el cultivo de las células endoteliales de la córnea en un tubo de ensayo, o puede ser aquél que tiene un papel de soporte de la capa de células endoteliales de la córnea tras el cultivo. Preferentemente, el material base usado en la presente divulgación es aquél que tiene un papel como estructura usada para cultivar células endoteliales de la córnea y someterse directamente a trasplante tras la finalización del cultivo.

El material base usado en la presente divulgación incluye, por ejemplo, material muy polimérico derivado de productos naturales tales como colágeno, gelatina y celulosa; material macromolecular sintético tal como poliestireno, poliéster, policarbonato y poli(N-isopropil acrilamida); material polimérico biodegradable tal como ácido poliláctico y ácido

poliglicólico; hidroxiapatita, amnios y similares.

La forma del material base usado en la presente divulgación no está particularmente limitada siempre que soporte la capa de células endoteliales de la córnea y tenga una forma adecuada para el trasplante. Sin embargo, la forma es preferentemente una lámina. Cuando la formulación de acuerdo con la presente divulgación está en una forma de lámina, puede cortarse y usarse en un tamaño de acuerdo con un sitio de aplicación en el trasplante. Además, es también posible enrollar la lámina hasta estrecharla e insertarla en una herida. como un ejemplo específico preferible, se ilustra una lámina circular que cubre aproximadamente un 80 % del área de un endotelio de córnea lesionado. Además, es también preferible cortar la porción periférica del círculo con el fin de que se adhiera estrechamente a un sitio de aplicación.

En un aspecto preferible, el ejemplo del material base usado en la presente divulgación es colágeno. Como colágeno, puede usarse preferentemente la lámina de colágeno descrita en la Publicación japonesa abierta a consulta n.º 2004-24852. La lámina de colágeno sujeto puede prepararse a partir de, por ejemplo, amnios, de acuerdo con el procedimiento descrito en la Publicación japonesa abierta a consulta n.º 2004-24852.

A partir de ahora en el presente documento, se describirá la preparación de la capa de células endoteliales de la córnea como un ejemplo de una formulación de endotelio de córnea.

La capa de células endoteliales de la córnea usada en la presente divulgación comprende preferentemente al menos una de las siguientes características. Más preferentemente, la capa de células endoteliales de la córnea usada en la presente invención comprende dos o más de las siguientes características. Aún más preferentemente, la capa de células endoteliales de la córnea usada en la presente divulgación comprende las siguientes características.

(1) La capa de células tiene una estructura monocapa. Esta es una de las características que las capas de células endoteliales de la córnea de organismos vivos comprenden.

(2) la densidad celular en la capa de células es aproximadamente de 1.000 a aproximadamente 4.000 células/mm<sup>2</sup>. En particular, la densidad celular es preferentemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 3.000 células/mm<sup>2</sup> cuando es receptor un adulto.

(3) La forma planar de las células que constituyen la capa de células es sustancialmente hexagonal. Esta es una de las características que comprenden las células que constituyen la capa de células endoteliales de la córnea en organismos vivos. La formulación de la presente divulgación es similar a las capas de células endoteliales de la córnea de organismos vivos, que es capaz de ejercer una función similar como las capas de células endoteliales de la córnea naturales y es capaz también de ejercer capacidad de crecimiento *in vivo*.

(4) Las células se disponen regularmente en la capa de células. En las capas de células endoteliales de la córnea de organismos vivos, las células que constituyen las capas se disponen regularmente. Por consiguiente, las funciones normales y la alta transparencia de las células endoteliales de la córnea se considera que se mantienen, y la función humectante de la córnea se ejerce adecuadamente. Por lo tanto, comprendiendo dichas características morfológicas, se espera que la formulación de acuerdo con la presente divulgación ejerza una función similar a la de las capas de células endoteliales de la córnea en organismos vivos.

El procedimiento de fabricación de acuerdo con la presente invención comprende la etapa de cultivar células endoteliales de la córnea usando el agente, la composición o el recipiente de acuerdo con la presente divulgación, y puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, el siguiente procedimiento.

<1> Extracción y cultivo de células endoteliales de la córnea en un tubo de ensayo

Las células endoteliales de la córnea se extrajeron de la córnea de un mismo receptor o un donante adecuado usando un procedimiento ordinario. En consideración a las condiciones de trasplante en la presente invención, pueden prepararse células endoteliales de la córnea derivadas de la misma raza.

Por ejemplo, la membrana de Descemet y la capa de células endoteliales de los tejidos de la córnea se exfolian a partir del parénquima de la córnea, se transfieren a una placa de cultivo y se tratan con dispasa o similar. En consecuencia, las células endoteliales de la córnea se desprenderán de la membrana de Descemet. Las células endoteliales de la córnea que permanecen en la membrana de Descemet pueden desprenderse mediante pipeteo o similar.

Tras la retirada de la membrana de Descemet, las células endoteliales de la córnea se cultivan en una solución de cultivo de acuerdo con la presente invención. Como para el cultivo o la solución de cultivo, por ejemplo, se puede usar lo siguiente: FBS( suero de feto de bovino) (por ejemplo, BLOWEST, número de catálogo: S1820-500), b-FGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos)(por ejemplo, INVITROGEN, número de catálogo: 13256-029), y una sustancia antibiótica, tal como penicilina y estreptomina, pueden añadirse de forma adecuada a DMEM comercialmente disponible (Medio Eagle modificado por Dulbecco) (por ejemplo, INVITROGEN, número de catálogo. 12320 o similar), seguido por la adición de componentes de un normalizador del cultivo de acuerdo con la presente invención. Mediante revestimiento del agente de acuerdo con la presente invención para llevar a cabo el cultivo, se promueve la adhesión de las células endoteliales de la córnea a la superficie de un recipiente de cultivo, llevando a cabo por tanto un crecimiento favorable. Además, cuando se lleva a cabo el cultivo añadiendo laminina a la solución del cultivo, es preferible usar una placa de cultivo, cuya superficie se reviste con colágeno de tipo I, colágeno de tipo IV, fibronectina,

laminina o matriz extracelular de células endoteliales de la córnea de bovino o similares. Alternativamente, es posible usar un recipiente de cultivo ordinario que se trata con un agente de revestimiento comercialmente disponible tal como el FNC coating mix® (50 ml(AES-0407), ATHENA, número de catálogo: 0407). Las condiciones de temperatura para cultivar células endoteliales de la córnea no están particularmente limitadas siempre que crezcan células endoteliales de la córnea. Por ejemplo, la temperatura está comprendida en el intervalo de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 45 °C, y cuando se toma en consideración la eficacia de crecimiento, es preferentemente de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, y aún más preferentemente aproximadamente 37 °C. El procedimiento de cultivo se lleva a cabo en dicho entorno de aproximadamente una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 al 10 % bajo humidificación, En una estufa incubadora normal de cultivo de células.

10 <2> Subcultivo

Después que las células endoteliales de la córnea sometidas a cultivo se hacen crecer, Se puede llevar a cabo el subcultivo. Preferentemente, se lleva a cabo el subcultivo en el momento de ser subconfluente o confluyente. El subcultivo puede llevarse a cabo del siguiente modo. En primer lugar, las células se tratan con tripsina-EDTA o similar de tal manera que las células se desprenden de la superficie del recipiente de cultivo. A continuación, las células se recogen. El normalizador del cultivo o el medio de acuerdo con la presente invención se añade a las células recogidas para obtener una suspensión de células. Es preferible llevar a cabo un tratamiento con centrifuga cuando las células se recogen o después de la recogida. El tratamiento con centrifuga sujeto permite la preparación de una suspensión de células con una alta densidad celular. La densidad celular preferible es aproximadamente de 1 a 2x10<sup>6</sup> células/ml. señalar que las condiciones para el tratamiento con centrifuga incluyen, sin limitación, por ejemplo, 500 rpm (30 g) a 1000 rpm (70 g), y 1 a 10 minutos.

La suspensión celular se siembra en un recipiente de cultivo similar al cultivo inicial anteriormente mencionado, sometiéndose por tanto a cultivo. Mientras que la tasa de dilución en el subcultivo varía de acuerdo con el estado de las células, pero es aproximadamente 1:2 a 1:4 y preferentemente 1:3. El subcultivo puede llevarse a cabo en condiciones de cultivo similares al cultivo inicial anteriormente mencionado. El tiempo de incubación varía de acuerdo con el estado de las células que se van a usar o similar, pero es de 7 a 30 días, por ejemplo. El subcultivo anteriormente mencionado puede llevarse a cabo múltiples veces según se considere necesario. Cuando se usa un agente de promoción de la adhesión celular (por ejemplo, un inhibidor de ROCK o similar) en el agente, la composición, el medio o el receptor de acuerdo con la presente invención, puede potenciarse la adhesión celular en un periodo inicial del cultivo, haciendo posible acortar el periodo de cultivo.

30 <3> Preparación de la capa de células endoteliales de la córnea

La suspensión celular se siembra sobre un material base tal como una lámina de colágeno, para someterla a cultivo. En esta fase, el número de células que se van a sembrar se ajusta de tal manera que se forma una densidad celular deseada de una capa de células en una formulación de endotelio de córnea que se fabrica en el extremo. De manera específica, las células se siembran de tal manera que se forma una capa de células de una densidad celular en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 4.000 células/mm<sup>2</sup>. El cultivo puede llevarse a cabo en condiciones similares al cultivo inicial anteriormente mencionado. El tiempo de incubación varía de acuerdo con el estado de las células que se van a usar, pero es, por ejemplo, de 3 a 30 días.

Llevando a cabo el cultivo como se ha descrito anteriormente, se obtiene una formulación de endotelio de córnea, en el que se forma una capa de células endoteliales de la córnea cultivada en el tubo de ensayo en el material base.

En la presente invención, la formulación de endotelio de la córnea puede comprender el agente o la composición de acuerdo con la presente invención, o un medio que comprende cualquiera de ellos, o la formulación del endotelio de la córnea puede mantenerse en un recipiente que contiene cualquiera de ellos, a fin de cultivar o hacer crecer células endoteliales de la córnea. la formulación del endotelio de córnea puede comprender el agente o la composición de acuerdo con la presente invención, o un medio que comprende cualquiera de ellos, o la formulación del endotelio de córnea puede mantenerse en un recipiente que contiene cualquiera de ellos, hasta que se somete a trasplante. La presente invención puede comprender una formulación de endotelio de córnea, el agente o la composición de acuerdo con la presente invención, o un medio que comprende cualquiera de ellos; y alternativamente, la presente invención proporciona una combinación con un recipiente que comprende cualquiera de ellos.

La formulación de endotelio de córnea obtenida mediante el procedimiento de fabricación de acuerdo con la presente invención puede usarse como un injerto en un tratamiento de enfermedades que requieren el trasplante del endotelio de córnea, tal como queratopatía bullosa, edema de córnea, leucoma de córnea, en particular, distrofia de córnea, y queratopatía bullosa producidas por un trastorno del endotelio de la córnea debido a una lesión externa o una cirugía oftálmica interna. La causa de dicha queratopatía bullosa, el trastorno del endotelio de la córnea o similar incluye un distrofia endotelial de la córnea de Fuchs, síndrome de pseudoexfoliación, endoteliitis de la córnea y similares, además de cirugía.

el sujeto para la administración de la formulación de endotelio de córnea de acuerdo con la presente invención incluye mamíferos (por ejemplo, seres humanos, ratones, ratas, hámsteres, conejos, gatos, perros, vacas, ovejas, monos y similares) y preferentemente, primates (por ejemplo, seres humanos).

(Tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o dolencia endotelial de la córnea)

La presente divulgación proporciona un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o dolencia endotelial de la córnea, que comprende células endoteliales de la córnea producidas mediante un procedimiento para cultivar o hacer crecer una célula endotelial de la córnea, que comprende la etapa de cultivar células endoteliales de la córnea usando un agente, composición o medio o un recipiente de la presente divulgación. Se entiende que un agente, composición, o medio o recipiente de la presente invención se puede usar en cualquier forma descrita en el presente documento. Por ejemplo, se pueden considerar las materias descritas en el presente documento, tales como (Una composición para cultivar o hacer crecer células endoteliales de la córnea), (Procedimiento para cultivar una célula endotelial de la córnea) y (célula endotelial de la córnea y formulación de endotelio de córnea). Además, se entiende que las células endoteliales de la córnea usadas como un medicamento pueden tomar cualquier forma usada en el presente documento. Por ejemplo, se puede considerar la materia descrita en (células endoteliales de la córnea y formulación endotelial de córnea).

En un aspecto, un medicamento de la presente divulgación es para el fin de tratar o prevenir el endotelio de la córnea de primates. Preferentemente, el sujeto de dicho tratamiento o prevención es un endotelio la córnea humano.

En un aspecto, las células endoteliales de la córnea usadas en un medicamento de la presente divulgación son de primates. Preferentemente, las células endoteliales de la córnea usadas en un medicamento de la presente invención son de un ser humano.

En un aspecto, la enfermedad, trastorno o dolencia endotelial de la córnea sobre la que hace diana un medicamento de la presente invención es queratopatía bullosa, endotelitis de la córnea, edema de córnea, leucoma y similar.

En un aspecto, se proporciona un medicamento de la presente invención en forma de lámina o como una suspensión.

En una realización, un medicamento de la presente invención comprende además un agente de promoción de la adhesión celular. El agente de promoción de la adhesión celular ejerce una acción de promoción de la adhesión sobre las células endoteliales de la córnea separadas del tejido de la córnea o las células endoteliales de la córnea separadas y subcultivadas. Dicho agente de promoción de la adhesión celular puede proporcionarse junto con o de forma separada de las células endoteliales de la córnea proporcionadas como un medicamento. En una realización específica, El agente de promoción de la adhesión celular usado en un medicamento de la presente invención incluye un inhibidor de la quinasa Rho. El inhibidor de la quinasa Rho incluye compuestos desvelados en las siguientes referencias: Patente de EE.UU. n.º 4678783, patente japonesa n.º 3421217, publicación internacional n.º WO 95/28387, publicación internacional n.º WO 99/2062, publicación internacional n.º WO 99/6140, publicación internacional n.º WO 02/076976, publicación internacional n.º WO 02/076977, publicación internacional n.º WO 2002/083175, publicación internacional n.º WO 02/100833, publicación internacional n.º WO 03/059913, publicación internacional n.º WO 03/062227, publicación internacional n.º WO 2004/009555, publicación internacional n.º WO 2004/022541, publicación internacional n.º WO 2004/108724, publicación internacional n.º WO 2005/003101, publicación internacional n.º WO 2005/039564, publicación internacional n.º WO 2005/034866, publicación internacional n.º WO 2005/037197, publicación internacional n.º WO 2005/037198, publicación internacional n.º WO 2005/035501, publicación internacional n.º WO 2005/035503, publicación internacional n.º WO 2005/035506, publicación internacional n.º WO 2005/080394, publicación internacional n.º WO 2005/103050, publicación internacional n.º WO 2006/057270, y publicación internacional n.º WO 2007/026664. Dichos compuestos pueden fabricarse mediante los procedimientos descritos en cada una de las referencias desveladas e incluyen, por ejemplo, 1-(5-Isoquinolinasulfonil)homopiperazina o una sal de la misma (por ejemplo, fasudil(1-(5-Isoquinolinasulfonil)homopiperazina)), y (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil) ciclohexanocarboxamida o una sal de la misma (por ejemplo, clorhidrato de Y-27632((R)-(+)-trans-(4-piridil)-4-(1-aminoetil)-ciclohexanocarboxamida monohidratado).

Las dianas de la administración (trasplantes) de un medicamento o procedimiento de la presente divulgación incluyen mamíferos (por ejemplo, seres humanos, ratones, ratas, hámsteres, conejos, gatos, perros, vacas, ovejas, monos y similares). Sin embargo, se prefieren los primates y se prefieren en particular los seres humanos. No se han conseguido resultados satisfactorios en un tratamiento endotelial de la córnea para primates. En este sentido, la presente divulgación proporciona un procedimiento y un medicamento terapéutico innovadores.

En otro aspecto, La presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o dolencia endotelial de la córnea, que comprende la etapa de usar las células endoteliales de la córnea producidas mediante un procedimiento para cultivar células endoteliales de la córnea de una manera normal, que comprende la etapa de cultivar células endoteliales de la córnea usando un agente, la composición, el medio. o un recipiente de la presente invención.

Tal como se ha descrito anteriormente, la presente invención se ha descrito presentando a la vez las realizaciones preferidas para facilitar la comprensión. A partir de ahora en el presente documento, la presente invención se describirá a través de Ejemplos. Sin embargo, la descripción anteriormente mencionada y los siguientes Ejemplos se proporcionan solo a fines ilustrativos y no se proporcionan con el fin de limitar la presente invención. Por consiguiente, el ámbito de la presente invención está limitado únicamente por las Reivindicaciones, no por las realizaciones o los

Ejemplos descritos específicamente en el presente documento.

### **[Ejemplos]**

5 A partir de ahora en el presente documento, se describirá un ejemplo en que las células de las células endoteliales de la córnea de acuerdo con la presente invención se cultivan normalmente. Cuando sea aplicable, los estándares que muestra el Ministerio de sanidad, trabajo y bienestar, el Ministerio de educación, cultura, deportes, ciencia y tecnología, o similares se observaron para la manipulación de las muestras biológicas o similares, y cuando fue aplicable, la manipulación se llevó a cabo basándose en la Declaración de Helsinki o las consideraciones éticas creadas basándose en la declaración de Helsinki. Con respecto a la donación de ojos para los estudios, se obtuvieron cartas de consentimiento de los familiares cercanos en relación con todos los donantes muertos. El presente estudio se homologó mediante la revisión ética del banco de ojos SightLife™ (Seattle, WA).

10 (Procedimiento experimental: Tejido de córnea humana de calidad de estudio)

Doce córneas de donantes humanos se obtuvieron cada una del banco de ojos SightLife™ y todas las córneas se preservaron en un medio de preservación (Optisol; Chiron Vision Corporation, Irvine, CA) a 4 °C durante un periodo de menos de 14 días antes del cultivo primario.

15 (Análisis estadístico)

Se determinó la diferencia estadísticamente significativa (valor P) en un valor promedio de una comparación de dos muestras usando el test de la t del test de la t de Student. La diferencia estadísticamente significativa en la comparación de una pluralidad de conjuntos de muestras se analizó utilizando el test de comparación múltiple de Dunnett. Los valores que se muestran en el gráfico representan el promedio ±SE.

20 (Ejemplo 1: Expresión de una cadena de laminina y una cadena de integrina en células endoteliales de la córnea y una membrana de Descemet)

En el presente Ejemplo, se observó la expresión de una cadena de laminina en la membrana de Descemet, que es una membrana basal de la célula endotelial de la córnea.

(Materiales y procedimientos)

25 Se llevó a cabo la expresión del ARNm de una cadena de laminina usando el procedimiento de la PCR. Aunque no se muestran los datos, se verificó la expresión de las proteínas mediante inmunotinción.

30 Se diluyó un anticuerpo secundario con PBS y la solución resultante se incubó durante treinta minutos a temperatura ambiente. Se usó anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo marcado (conjugado) con Alexa™ Fluor 488 (Número de catálogo: A11034; 1:1500; Molecular Probe-Invitrogen) como el anticuerpo secundario. Tras agitar y lavar dos veces con Triton al 0,15 %/PBS y una vez con PBS, se llevó a cabo la tinción nuclear con yoduro de propidio (Número de catálogo: SP29004-41; PI; Nacalai Tesque, Inc. Kyoto, Japón) y el anticuerpo secundario se incluyó cubriéndolo con una cubierta de vidrio. Se observó el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia con un microscopio de barrido de láser confocal (Olympus Fluoview, Tokyo, Japón) y se tomó una fotografía del mismo.

35 Se muestran en la siguiente Tabla 1 las secuencias de cebadores de cadenas de laminina usadas en un procedimiento de la PCR. Se muestran en la siguiente Tabla 2 las secuencias de cebadores de las cadenas de integrina usadas en un procedimiento de la PCR. Se obtuvieron los cebadores de Life Technologies Japan Ltd (Número de catálogo: 10336022).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para la PCR

Gen	Cebador de sentido directo	Cebador de sentido contrario	Tamaño (pb)
<i>Laminin a α1</i>	5'-GAGTCCGTCTCTCTGGACATAG-3' (SEQ ID NO: 9)	5'-CGTGGCATTACAGGGTTGAC-3' (SEQ ID NO: 10)	180
<i>Laminin a α2</i>	5'-TGCTAGAATTTACCTCCGCTCG-3' (SEQ ID NO: 11)	5'-GATCAAGTGGACAAGCCCTG-3' (SEQ ID NO: 12)	203
<i>Laminin a α3</i>	5'-CTCCAAAGGCCCAACTCAAG-3' (SEQ ID NO: 13)	5'-CCATAACTGCCTCCTTAGTCTC-3' (SEQ ID NO: 14)	304
<i>Laminin a α4</i>	5'-CTTACGCAACACCACCGGATTC-3' (SEQ ID NO: 15)	5'-CCTTCTTCCAAGCAIICTCCG-3' (SEQ ID NO: 16)	140
<i>Laminin a α5</i>	5'-GAGGACTOAGTOAAAACCTCAA-3' (SEQ ID NO: 17)	5'-CCACTGAAGTTGTAAATGGTG-3' (SEQ ID NO: 18)	221

<i>Laminin a β1</i>	5'-GATGGTGAACCTTGAIGAAAAGT-3' (SEQ ID NO: 19)	5'-GGCTTATACCTTTAGGAGTGA-3' (SEQ ID NO: 20)	258
<i>Laminin a β2</i>	5'-GATGATCGCATCCAAGGGAC-3' (SEQ ID NO: 21)	5'-GTCCAGAGTAGGGAGTCTCAG-3' (SEQ ID NO: 22)	150
<i>Laminin a β3</i>	5'-CCCAGATGGAGGAAGATGTC-3' (SEQ ID NO: 23)	5'-GTAGCTGAGTCTGTGGGCAG-3' (SEQ ID NO: 24)	144
<i>Laminin a β4</i>	5'-GGCAGGCTACTTTGGATTTC-3' (SEQ ID NO: 25)	5'-GCTTGAGGGATCATCTGGAC-3' (SEQ ID NO: 26)	204
<i>Laminin a γ1</i>	5'-GATGAGATGGIGACAGATCAAG-3' (SEQ ID NO: 27)	5'-TTTCGAGTCTCTTCAATGGTAT-3' (SEQ ID NO: 28)	199
<i>Laminin a γ2</i>	5'-ATCGAAGGTTACTGCGGAATC-3' (SEQ ID NO: 29)	5'-GTAGCCAGAAGCACAACTCTG-3' (SEQ ID NO: 30)	193
<i>Laminin a γ3</i>	5'-GGGATACAAGAGGGAGATGC-3' (SEQ ID NO: 31)	5'-CATAGAAACCTGGCAAACAGC-3' (SEQ ID NO: 32)	157

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para la PCR

Gen	Cebador de sentido directo	Cebador de sentido contrario	Tamaño (pb)
<i>Integrina α1</i>	5'-gaagaacctcctgaaaccctt-3' (SEQ ID NO: 33)	5'-tgatgtcatattggggaatgaa-3' (SEQ ID NO: 34)	254
<i>Integrina α2</i>	5'-tgatgggacagaagtaacatgc-3' (SEQ ID NO: 35)	5'-tggaccaacatctcaaaaactg-3' (SEQ ID NO: 36)	333
<i>Integrina α3</i>	5'-gctctgccttggttatctgt-3' (SEQ ID NO: 37)	5'-ttcccactagaaggctctggta-3' (SEQ ID NO: 38)	257
<i>Integrina α4</i>	5'-atattcagtcggagctggatcat-3' (SEQ ID NO: 39)	5'-gcatattgtcactccaacga-3' (SEQ ID NO: 40)	338
<i>Integrina α5</i>	5'-tcctcagcaagaatctcaaaa-3' (SEQ ID NO: 41)	5'-gttgagtcctgtaactctggtc-3' (SEQ ID NO: 42)	304
<i>Integrina α6</i>	5'-agcaaggcagatggaataatgt-3' (SEQ ID NO: 43)	5'-cagggttaggaatttcgatcaag-3' (SEQ ID NO: 44)	275
<i>Integrina α7</i>	5'-caggtcaccttetacatcc-3' (SEQ ID NO: 45)	5'-accgtgacctcacttgacct-3' (SEQ ID NO: 46)	262
<i>Integrina α8</i>	5'-atggaaaatgaaccaggatgg-3' (SEQ ID NO: 47)	5'-cagttatgaatggcagaacaa-3' (SEQ ID NO: 48)	265
<i>Integrina α9</i>	5'-cacttcagcccataatca-3' (SEQ ID NO: 49)	5'-acagtgctgttaggcaagaa-3' (SEQ ID NO: 50)	305
<i>Integrina α10</i>	5'-atcagtggttcagaggact-3' (SEQ ID NO: 51)	5'-gccctggctttagtattgtc-3' (SEQ ID NO: 52)	330
<i>Integrina α11</i>	5'-ggacactgctgactacgtgaag-3' (SEQ ID NO: 53)	5'-gcgtgtgctctctatgatgaag-3' (SEQ ID NO: 54)	294

(continuación)

Gen	Cebador de sentido directo	Cebador de sentido contrario	Tamaño (pb)
<i>Integrina αE</i>	5'-tagcagtgagaagctgacgag-3' (SEQ ID NO: 55)	5'-tcttcaggaagacgacagtga-3' (SEQ ID NO: 56)	300
<i>Integrina αV</i>	5'-atctgtgaggtcgaacaggat-3' (SEQ ID NO: 57)	5'-accttgccaataaaagctacca-3' (SEQ ID NO: 58)	255
<i>Integrina αL</i>	5'-gaaccattgacaccagaagtga-3' (SEQ ID NO: 59)	5'-ttctcaaaccctcaactgtctt-3' (SEQ ID NO: 60)	341
<i>Integrina αM</i>	5'-gatcggctaagagaaggacaga-3' (SEQ ID NO: 61)	5'-cattgccacaattctctcaaaa-3' (SEQ ID NO: 62)	330

<i>Integrina aX</i>	5'-ccaacatctgcctttacattga-3' (SEQ ID NO: 63)	5'-cgtgaagtatctctgagcatcg-3' (SEQ ID NO: 64)	331
<i>Integrina aD</i>	5'-ttaaccagatgaagggtttgt-3' (SEQ ID NO: 65)	5'-ggtctttgtactctgccatc-3' (SEQ ID NO: 66)	296
<i>Integrina aIIb</i>	5'-gaaaagactgaggaggctgaga-3' (SEQ ID NO: 67)	5'-gagaaaatatccgcaactggag-3' (SEQ ID NO: 68)	245
<i>Integrina β1</i>	5'-gctgaagactatcccattgacc-3' (SEQ ID NO: 69)	5'-attccagatagcgctgtttt-3' (SEQ ID NO: 70)	321
<i>Integrina β2</i>	5'-tgatggacctctcctactccat-3' (SEQ ID NO: 71)	5'-gaaactggttgaggtgtgt-3' (SEQ ID NO: 72)	258
<i>Integrina β3</i>	5'-tgtttaccactgatgccaagac-3' (SEQ ID NO: 73)	5'-tcccataagcatcaacaatgag-3' (SEQ ID NO: 74)	308
<i>Integrina β4</i>	5'-gcttcacacctattccctgtc-3' (SEQ ID NO: 75)	5'-gaaggaaggtttcagatggatg-3' (SEQ ID NO: 76)	316
<i>Integrina β5</i>	5'-gctggtgttcacaacagatgat-3' (SEQ ID NO: 77)	5'-atcccagactgacaactctact-3' (SEQ ID NO: 78)	349
<i>Integrina β6</i>	5'-tgtgactgtgglaagtgtgt-3' (SEQ ID NO: 79)	5'-caccagctagttgcactgtc-3' (SEQ ID NO: 80)	289
<i>Integrina β7</i>	5'-cacttcagacgacacattccat-3' (SEQ ID NO: 81)	5'-cccactgcagacttaggaatc-3' (SEQ ID NO: 82)	250
<i>Integrina β8</i>	5'-gcattatgtcgaccaaactca-3' (SEQ ID NO: 83)	5'-atttctcaggcttctcacgtc-3' (SEQ ID NO: 84)	255

\*Procedimiento de la PCR: Se llevó a cabo el procedimiento de la PCR en cada cadena de laminina y la cadena de integrina mediante la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa mediante transcripción inversa semicuantitativa). Se adquirieron los cebadores de INVITROGEN, que es una compañía de síntesis de oligonucleótidos, y se usaron aquellos en los que se había llevado a cabo un tratamiento de desalación. Se usó el Mini kit RNEasy (QIAGEN GmbH, Número de catálogo: 74106) para la extracción del ARN total de las células. Una membrana de Descemet que incluía células endoteliales de la córnea se exfolió de una córnea para su uso en investigación que se adquirió del banco de ojos Seattle y las células endoteliales de la córnea se exfoliaron mecánicamente con la membrana basal para su uso en la extracción de la córnea de las células endoteliales de la córnea. Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa (42 °C, sesenta minutos) sobre el ARN con ReverTra Ace (Toyobo Co., Ltd. (número de catálogo: TRT-101)), y CD166 y CD73 se amplificaron con GAPDH como patrón interno usando una Versión TAKARA Taq HotStart de la ADN polimerasa (Takara Bio Inc, Número de catálogo: RR001A). La misma cantidad de ADNc se amplificó mediante un dispositivo de la PCR (GeneAmp 9700; Applied Biosystems) y la siguiente pareja de cebadores. En la reacción de la PCR, se usaron los cebadores que se muestran en la Tabla 1, la Tabla 2 y aquellos descritos a continuación.

\*GAPDH-F:GAGTCAACGGATTTGGTCTG (SEQ ID NO: 85)

\*GAPDH-R:TTGATTTTGGAGGGATCTCG (SEQ ID NO: 86)

Un fragmento de ADNc amplificado se sometió a electroforesis con un gel de agarosa al 1,5 % (Nacalai Tesque, Número de catálogo: 01149-76) y se detectó mediante la tinción con bromuro de etidio (Nacalai Tesque, Número de catálogo: 14603-51).

\* Citometría de flujo: Se sembró un endotelio de córnea humano en una placa de cultivo revestida con revestimiento FNC y se cultivó durante aproximadamente 14 días hasta alcanzar el estado de confluencia bajo la condición de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C. Las células se exfoliaron con TrypLE™ Select y se recogieron. A continuación, se llevó a cabo el análisis sobre un antígeno superficial de la cadena de integrina usando un citómetro de flujo (BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)) de acuerdo con el manual de instrucciones usando a la un Human Cell Surface Marker Screening Panel (BD Lyoplate™, BD Bio-sciences, Franklin Lakes, NJ).

La célula endotelial de la córnea humana se cultivó como se describe a continuación. la membrana de descemet que incluía células endoteliales de la córnea se exfolió de una córnea para su uso en investigación que se adquirió del Banco de ojos Seattle y la célula endotelial de la córnea se exfolió mecánicamente con la membrana basal. tras el desprendimiento (normalmente, tratado durante dos horas a 37 °C usando 1 mg/ml de colagenasa A (Roche Applied Science)) y recogida de la membrana basal usando colagenasa (ROCHE Número de catálogo: 10 103 586 001), se llevó a cabo el cultivo primario. Para el medio, se usó un medio en el que se acondicionó lo siguiente para un alimentador de células 3T3: Medio líquido de suero reducido Opti-MEM I, (INVITROGEN, Número de catálogo: 31985-070) + suero de feto de bovino al 8 % (FBS) (BIOWEST, Número de catálogo: S1820-500) + 200 mg/ml de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (SIGMA Número de catálogo: C7902-500G) + sulfato de condroitina al 0,08 % (SIGMA número de catálogo: C9819-5G) + 20 µg/ml de ácido ascórbico (SIGMA Número de catálogo: A4544-25G) + 50 µg/ml de gentamicina

(INVITROGEN Número de catálogo: 15710-064) + 5 ng/ml de EGF (INVITROGEN Número de catálogo: PHG0311). De manera específica, tras la digestión a 37 °C, HCEC obtenido de una córnea individual se resuspendió en un medio de cultivo y se sembró en placas en un pocillo de una placa de 12 pocillos revestido con la FNC Coating Mix™. El medio de cultivo se preparó de acuerdo con el protocolo publicado al cual se añadió una alteración parcial. Explicado de forma breve, se preparó un medio de cultivo básico, que contenía OptiMEM-I (Life Technologies), FBS al 8 %, 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), 1 µM de SB431542 (Merck Millipore), 20 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 200 mg/l de cloruro de calcio (Sigma-Aldrich), 0,08 % de sulfato de condroitina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka) y 50 µg/ml de gentamicina. A continuación, se recogió un medio acondicionado tras cultivar fibroblastos 3T3 inactivados. La inactivación de los fibroblastos 3T3 se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Explicado de forma breve, se incubaron fibroblastos 3T3 confluentes durante dos horas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % con 4 µg/ml de mitomicina C (MMC) (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Tokyo) y a continuación lo resultante se trató con tripsina y se sembró en placas sobre una placa elástica a una densidad de 2x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Se cultivó HCEC en una atmósfera humidificada a 37 °C en 5 % CO<sub>2</sub>, y el medio de cultivo se sustituyó cada tres días. Cuando HCEC alcanza el estado de confluencia en 14 a 28 días, se enjuagó HCEC en Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> exento de PBS, tratado con tripsina con tripsina-EDTA al 0,05 % durante cinco minutos a 37 °C, y a continuación se subcultivó a una relación de 1:2.

(Resultados)

Cuando se observó la expresión de la cadena de laminina en la membrana de Descemet (membrana basal de las células endoteliales de la córnea), la expresión de la cadena de laminina α5, cadena de laminina β1, t cadena de laminina γ1 fue prominente. Por otro lado, la expresión de la cadena de laminina α1, cadena de laminina α2, y cadena de laminina α3 no fue evidente (no se muestran los datos).

Como se muestra en la Figura 1, cuando se observó la expresión del ARNm de las cadenas de laminina de las células endoteliales de la córnea humana, la expresión de la cadena de laminina α5, cadena de laminina β1, cadena de laminina β2, t cadena de laminina γ1 fue prominente. Por otro lado, la expresión de la cadena de laminina ex1, cadena de laminina α2, cadena de laminina α3, cadena de laminina α4, cadena de laminina β3, cadena de laminina γ2, y cadena de laminina γ3 no fue evidente.

Como se muestra en la Figura 2, se reconoció la expresión en la cadena de integrina α1, cadena de integrina α2, cadena de integrina α3, cadena de integrina α6, cadena de integrina α10, cadena de integrina α11, cadena de integrina β1, cadena de integrina β5, cadena de integrina β8, y cadena de integrina αV. Se reconoció también una expresión ligera en la cadena de integrina β3, cadena de integrina β4, y cadena de integrina β6. Por consiguiente, la materia anterior sugiere que las células endoteliales de la córnea expresan al menos una de α1 β1, α2β1, α3β1, α6β1, α7β1 y α6β4, que son integrinas conocidas como una integrina de unión a laminina.

Como se muestra en la Figura 3 (Fig. 3A, 3B y 3C), se reconoció la expresión de la cadena de la integrina α1, cadena de integrina α2, cadena de integrina α3, la cadena de la integrina α5, y la cadena de la integrina β1 como la expresión de un antígeno superficial.

(Ejemplo 2: Promoción de la adhesión celular de Células endoteliales de la córnea humana)

En el presente ejemplo, se usó un recipiente de cultivo revestido con laminina o similar para confirmar si la adhesión celular podría realizarse o no para las células endoteliales de la córnea humana.

(Materiales y procedimientos)

- \*laminina 511 (LN511, VERITAS Corporation)
- \*laminina 521(LN521, VERITAS Corporation)
- \*fragmento de laminina 511-E8 (382-02413, Nippi. Inc.)
- \*FNC coating mix® (50 ml(AES-0407), ATHENA, número de catálogo: 0407)
- \*gelatina (G1890-500G, Sigma-Aldrich Co. LLC.)
- \*recipiente (3526, CORNING)

(Procedimiento) \*Células endoteliales de la córnea humana (HCEC, Procedimiento de fuente y cultivo): se llevó a cabo el cultivo de HCEC como en el Ejemplo 1 mencionado anteriormente. Las células cultivadas se lavaron en Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> exentos de PBS, y se tripsinizaron a 37 °C durante cinco minutos con tripsina-EDTA al 0,05 %, seguido por siembra en placas de 12 pocillos revestidas con FNC Coating Mix®. El medio de cultivo se preparó de acuerdo con el protocolo publicado al cual se añadió una alteración parcial. Hablando de forma breve, se preparó un medio de cultivo fundamental que contenía OptiMEM-I(Life Technologies), FBS al 8 %, 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), 10 µM de SB431542 (Merck Millipore), 20 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 200 mg/l de cloruro de calcio (Sigma-Aldrich), 0,08 % de sulfato de condroitina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka) y 50 µg/ml de gentamicina. A continuación, tras cultivar células de fibroblastos 3T3 inactivadas, se recuperó el medio acondicionado. La inactivación de las células de fibroblastos 3T3 se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Hablando de forma breve, las células de fibroblastos 3T3 confluentes se incubaron juntas con 4 µg/ml de mitomicina C (MMC) (Kyowa Hakko Kirin Col, Ltd, Tokyo) en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C durante dos horas, seguido por tratamiento con tripsina, y siembra en placas a una densidad de 2x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> sobre una placa

de plástico. Las HCEH se cultivaron con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C en una atmósfera humidificada, y el medio de cultivo se sustituyó cada tres días.

(Procedimiento) Las HCEC se sembraron en cada pocillo de placas de 96 pocillos revestidos con laminina 511, laminina 521, laminina 211, gelatina, FNC Coating Mix®, y se observaron las células formadas después 24 horas usando un microscopio de contraste de fases. La siembra se llevó a cabo a una densidad de siembra de 5.000 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos, y se examinó el número de células adheridas en el punto de las 24 horas después de la siembra de células usando un Ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos). Además, se evaluó la adhesión celular para las placas de cultivo revestidas con un fragmento de laminina 511-E8 (0,001-1,5 µg/cm<sup>2</sup>). Además, se añadieron diversas concentraciones de laminina 521 y fragmentos de laminina 511-E8 a los medios para la siembra y se evaluó de forma similar el número de células después de 24 horas.

(Medición del crecimiento celular mediante captación de BrdU)

De forma similar, se evaluó la captación de BrdU de HCEC revestidas con diversas matrices mediante ELISA. Se llevó a cabo la siembra en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de siembra de 5.000 células/pocillo, seguido por cultivo durante la noche. A continuación, se añadió 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) al medio, seguido por cultivo durante la noche. Se retiró el medio, y se añadió una solución fijadora (Amersham cell proliferation biotrak ELISA system, versión 2) para la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se retiró la solución fijadora, y se añadió una solución de bloqueo (Amersham cell proliferation biotrak ELISA system, versión 2), seguido por una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se retiró la solución de bloqueo, y se añadió anticuerpo dirigido contra BrdU conjugado con peroxidasa, seguido por una incubación de 90 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado, y se añadió matriz de TMB (3,3',5,5'-tetrametil bencidina) (Amersham cell proliferation biotrak ELISA system, versión 2), seguido por una incubación de 5 a 30 minutos. La reacción se detuvo usando ácido sulfúrico 1 M, y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas. Se mostró el resultado como un valor promedio de cinco mediciones ± el error estándar.

(Resultado)

Como se muestra en la Figura 4, en presencia de laminina 511 y laminina 521, la adhesión y la extensión de las células endoteliales de la córnea fueron favorables, mientras que el crecimiento no fue favorable en otras condiciones.

Como se muestra en la Figura 5, en presencia de laminina 511 y laminina 521, se mostró que la adhesión celular de las células endoteliales de la córnea era favorable en comparación a otras condiciones.

Como se muestra en la Figura 6, En presencia de un fragmento de laminina 511-E8, se mostró que el crecimiento celular de células endoteliales de la córnea era favorable en comparación con otras condiciones. En particular, la adhesión celular se promovió favorablemente en la concentración de 0,1 a 1,5 µg/cm<sup>2</sup>.

Como se muestra en la Figura 7, en presencia de laminina 511, laminina 521 y un fragmento de laminina 511-E8, se mostró que el crecimiento celular de células endoteliales de la córnea era favorable en comparación con otras condiciones.

(Ejemplo 3: Análisis funcional de la laminina 511 y la laminina 521 en un cultivo celular de Células endoteliales de la córnea humana)

En el presente ejemplo, se llevó a cabo el análisis funcional de la laminina 511 y la laminina 521 en cultivos celulares de células endoteliales de la córnea humana.

(Materiales y procedimientos)

\*Células endoteliales de la córnea humana (HCEC, Procedimiento de fuente y cultivo): Se llevó a cabo el cultivo de HCEC de la siguiente forma. Hablando de forma breve, las membranas de Descemet incluyendo células endoteliales de la córnea se exfoliaron de las de las córneas para su uso en investigación adquiridas del Banco de ojos Seattle; a continuación se exfolió mecánicamente la membrana basal junto con las células endoteliales de la córnea, que se exfoliaron después de la membrana basal usando colagenasa (ROCHE, número de catálogo: 10 103 586 001) (normalmente, se trataron durante dos horas usando 1 mg/ml de colagenasa A(Roche Applied Science) a 37 °C). tras la recuperación, se llevó a cabo el cultivo primario. En el cultivo primario, se llevó a cabo la siembra en placas a 1 pocillo de placas de 12 pocillos revestidos con laminina 511, laminina 521, laminina 211, FNC Coating Mix®. Para el medio se usó el mismo producto que en el Ejemplo 1. Se llevó a cabo la observación celular durante un periodo de tiempo utilizando un microscopio de contraste de fases.

\*Procedimiento de observación de células para la tinción o similares (ensayo histológico): tras inmovilizar las HCEC cultivadas, se llevó a cabo la inmunotinción usando ZO-1, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa como un marcador relacionado con la función seguido por observación usando un microscopio de fluorescencia. Las HCEC se inmovilizaron con formaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA), seguido por incubación con albúmina de suero bovino al 1 % (BSA) durante 30 minutos. Se llevó a cabo el análisis químico del tejido inmunitario para la proteína relacionada con unión estrecha, ZO-1, y una proteína relacionada con una función de bombeo, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-

ATPasa. Cada uno de los anticuerpos primarios se usó en una dilución 1:200. Para el anticuerpo secundario, se usó una dilución 1.2000 de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón marcado con Alexa Fluor™ 594 o marcado con Alexa Fluor™ 488 (Life Technologies). A continuación, los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). A continuación, se observaron los portas usando un microscopio de fluorescencia (BZ-9000; Keyence, Osaka, Japón).

\*Anticuerpos contra Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa: se usaron los preparados por MILLIPORE (MILLIPORE número de catálogo: 05-369).

\*Anticuerpos contra ZO-1: se usaron los preparados por Rabbit ZYMED LABORATORIES (ZYMED LABORATORIES número de catálogo: 61-7300).

10 (Resultado)

Como se muestra en la Figura 8, la laminina 511 y la laminina 521 mostraron realizar el cultivo de células de las células endoteliales de la córnea humana de forma más eficaz. Las fotografías muestran células dos días después del cultivo primario mediante un microscopio de contraste de fases.

15 Como se muestra en la Figura 9, la laminina 511 y la laminina 521 mostraron permitir el cultivo de células endoteliales de la córnea humana con una alta densidad de células. Las fotografías muestran células veinte días después del cultivo primario mediante un microscopio de contraste de fases.

20 como se muestra en las Figuras 10 y 11, la laminina 511 y la laminina 521 mostraron retener la actividad de ZO-1 y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, y se demostró que el cultivo usando el procedimiento de acuerdo con la presente invención permite el crecimiento manteniendo a la vez las funciones normales. La densidad celular en la laminina 511 y la laminina 521 fue mayor en comparación con la laminina 211 y el control sin revestir.

Como se muestra en la Figura 12, la laminina 521 y el fragmento de laminina 511-E8 de diversas concentraciones se añadieron a los medios que se iban a sembrar, promoviendo por tanto la adhesión celular de las células endoteliales de la córnea.

(Ejemplo 4: formulaciones ilustrativas: Solución de cultivo para preparar una lámina de endotelio de córnea)

25 En el presente Ejemplo, como ejemplo de formulación, se fabricó del siguiente modo una solución de cultivo para preparar una lámina de endotelio de córnea que contenía un agente de la presente invención.

Se preparó una solución de cultivo que se muestra a continuación con un procedimiento convencional. Laminina 511, laminina 521 y/o un fragmento de la misma (0,75 µg/cm<sup>2</sup>)

Suero de feto de bovino (FBS)	10 ml
solución de penicilina-estreptomina	1 ml
FGF básico	200 ng
DMEM	cantidad adecuada
cantidad total	100 ml

30 Por ejemplo, BLOWEST (Número de catálogo: S1820-500) o los fabricados por Invitrogen se puede usar para el FBS. Para la solución de penicilina-estreptomina, se pueden usar los fabricados por Nacalai Tesque (que contienen 5000 µg/ml de penicilina, 5000 µg/ml de estreptomina). Además, por ejemplo, para el FGF básico, se pueden usar los fabricados por Invitrogen (INVITROGEN, Número de catálogo: 13256-029). Para el SB431542, se pueden usar los fabricados por Tocris Cookson Ltd, y para SB203580, los fabricados por la marca CALBIOCHEM. Para DMEM, se pueden usar los fabricados por Invitrogen.

35 (Ejemplo 5: formulaciones ilustrativas: composición para un recipiente para preservar o amplificar la córnea)

En el presente Ejemplo, como ejemplo de formulación, una solución para revestir un recipiente que comprende un agente de la presente invención se fabricó del siguiente modo.

Se preparó una solución de preservación que se muestra a continuación mediante un procedimiento convencional. Laminina 511, laminina 521 y/o un fragmento de la misma (0,75 µg/cm<sup>2</sup>)

40 Una cantidad adecuada de un tampón adecuado  
Cantidad total 100 ml

Cada ingrediente puede obtenerse de forma similar al Ejemplo 4.

45 Tal como se ha descrito anteriormente, la presente invención se ilustra mediante el uso de las realizaciones preferidas de la presente invención. Sin embargo, se entiende que el ámbito de la presente invención debe interpretarse únicamente basándose en las reivindicaciones. La solicitud sujeto reivindica la prioridad de la solicitud de patente japonesa n.º 2013-244972 presentada el 27 de noviembre de 2013.

**[Aplicabilidad industrial]**

Se proporcionan componentes de cultivo y un procedimiento de cultivo para promover el crecimiento de células del endotelio de la córnea. Se proporciona una técnica disponible en la industria asociada con una técnica relacionada con los implantes de córnea (industria de cultivo de células, fabricación de fármacos y similares).

(Texto libre del listado de secuencias)

- 5 SEQ ID NO: 1 secuencia de ácido nucleico de la cadena de laminina  $\alpha$ 5 (NM\_005560)  
 SEQ ID NO: 2 secuencia de aminoácidos de la cadena de laminina  $\alpha$ 5 (NM\_005551)  
 SEQ ID NO: 3 secuencia de ácido nucleico de la cadena de laminina  $\beta$ 1 (NM\_002291)  
 SEQ ID NO: 4 secuencia de aminoácidos de la cadena de laminina  $\beta$ 1 (NM\_002282)  
 SEQ ID NO: 5 secuencia de ácido nucleico de la cadena de laminina  $\beta$ 2 (NM\_002292)  
 10 SEQ ID NO: 6 secuencia de aminoácidos de la cadena de laminina  $\beta$ 2 (NM\_002283)  
 SEQ ID NO: 7 secuencia de ácido nucleico de la cadena de laminina  $\gamma$ 1 (NM\_002293)  
 SEQ ID NO: 8 secuencia de aminoácidos de la cadena de laminina  $\gamma$ 1 (NM\_002284)  
 SEQ ID NO: 9 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\alpha$ 1: 5'-  
 GAGTCCGTCTCTGACATAG-3'  
 15 SEQ ID NO: 10 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\alpha$ 1: 5'-  
 CGTGCCATTCACAGGGTTGAC-3'  
 SEQ ID NO: 11 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\alpha$ 2: 5'-  
 TGCTAGAATTTACCTCCGCTCG-3'  
 20 SEQ ID NO: 12 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\alpha$ 2: 5'-  
 GATCAAGTGGACAAGCCCTG-3'  
 SEQ ID NO: 13 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\alpha$ 3: 5'-  
 CTCCAAAGGCCCAACTCAAG-3'  
 SEQ ID NO: 14 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\alpha$ 3: 5'-  
 CCATAACTGCCTTAGTCTC-3'  
 25 SEQ ID NO: 15 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\alpha$ 4: 5'-  
 CTTACGCAACACCACCGATTTC-3'  
 SEQ ID NO: 16 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\alpha$ 4: 5'-  
 CCTTCTTCCAAGCATTCTCCG-3'  
 30 SEQ ID NO: 17 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\alpha$ 5: 5'-  
 GAGGACTGAAGTAAAACTCAA-3'  
 SEQ ID NO: 18 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\alpha$ 5: 5'-  
 CCACTGAAGTTGTAAATGGTG-3'  
 35 SEQ ID NO: 19 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\beta$ 1: 5'-  
 GATGGTGAAGTTGATGAAAAGT-3'  
 SEQ ID NO: 20 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\beta$ 1: 5'-  
 GGCTTATATCCTTAGGAGTGA-3'  
 SEQ ID NO: 21 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\beta$ 2: 5'-  
 GATGATCGCATCCAAGGGAC-3'  
 40 SEQ ID NO: 22 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\beta$ 2: 5'-  
 GTCCAGAGTAGGGAGTCTCAG-3'  
 SEQ ID NO: 23 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\beta$ 3: 5'-  
 CCCAGATGGAGGAAGATGTC-3'  
 SEQ ID NO: 24 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\beta$ 3: 5'-  
 GTAGCTGAGTCTGTGGGCAG-3'  
 45 SEQ ID NO: 25 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\beta$ 4: 5'-  
 GGCAGGCTACTTTGGATTTTC-3'  
 SEQ ID NO: 26 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\beta$ 4: 5'-  
 GCTTGAGGGATCATCTGGAC-3'  
 50 SEQ ID NO: 27 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\gamma$ 1: 5'-  
 GATGAGATGGTGACAGATCAAG-3'  
 SEQ ID NO: 28 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\gamma$ 1: 5'-  
 TTTCCAGTCTTCAATGGTAT-3'  
 SEQ ID NO: 29 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\gamma$ 2: 5'-  
 ATCGAAGTTACTGCGGAATC-3'  
 55 SEQ ID NO: 30 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\gamma$ 2: 5'-  
 GTAGCCAGAAGCACAATCCTG-3'  
 SEQ ID NO: 31 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de laminina  $\gamma$ 3: 5'-  
 GGGATACAAGAGGGAGATGC-3'  
 SEQ ID NO: 32 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de laminina  $\gamma$ 3: 5'-  
 60 CATAGAAACCTGGCAAACAGC-3'  
 SEQ ID NO: 33 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha$ 1: 5'-gaagaacctctgaaacctttt-  
 3'  
 SEQ ID NO: 34 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha$ 1: 5'-tgatgtcatattggggaatgaa-  
 3'

## ES 2 763 433 T3

SEQ ID NO: 35 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 2$ : 5'-tgatgggacagaagtaacatgc-3'

SEQ ID NO: 36 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 2$ : 5'-tggaccaacatcttcaaaactg-3'

5 SEQ ID NO: 37 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 3$ : 5'-gctctgcctttgtttatctgt-3'

SEQ ID NO: 38 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 3$ : 5'-ttccactagaaggctcgggta-3'

SEQ ID NO: 39 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 4$ : 5'-atattcagtcggagctggcat-3'

10 SEQ ID NO: 40 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 4$ : 5'-gcatattgtcacttccaacga-3'

SEQ ID NO: 41 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 5$ : 5'-tctcagcaagaatctcaacaa-3'

SEQ ID NO: 42 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 5$ : 5'-gttgagtcctgaactctggtc-3'

15 SEQ ID NO: 43 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 6$ : 5'-agcaaggcagatggaataatgt-3'

SEQ ID NO: 44 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 6$ : 5'-caggtaggaatttcgtaag-3'

20 SEQ ID NO: 45 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 7$ : 5'-caggtcaccttctacctcatcc-3'

SEQ ID NO: 46 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 7$ : 5'-accgtgacctcacttgacct-3'

SEQ ID NO: 47 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 8$ : 5'-atggaaaatgtaaccagatgg-3'

25 SEQ ID NO: 48 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 8$ : 5'-cagttatgaatggcagaacaa-3'

SEQ ID NO: 49 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 9$ : 5'-cactttcagccatcaatatca-3'

30 SEQ ID NO: 50 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 9$ : 5'-acagtgtgctgttagcaagaa-3'

SEQ ID NO: 51 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 10$ : 5'-atcagtggttcagagggact-3'

SEQ ID NO: 52 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 10$ : 5'-gccctggctttgtagtattgtc-3'

35 SEQ ID NO: 53 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 11$ : 5'-ggacactgctgactacgtgaag-3'

SEQ ID NO: 54 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 11$ : 5'-gcgtgtgctctctatgatgaag-3'

40 SEQ ID NO: 55 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha E$ : 5'-tagcagtgagaagctgacgag-3'

SEQ ID NO: 56 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha E$ : 5'-tcttcaggaagacgacagtga-3'

45 SEQ ID NO: 57 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha V$ : 5'-atctgtgaggtcgaaacaggat-3'

SEQ ID NO: 58 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha V$ : 5'-acctgccaataaaagctacca-3'

SEQ ID NO: 59 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha L$ : 5'-gaaccattgacaccagaagtga-3'

50 SEQ ID NO: 60 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha L$ : 5'-ttcttcaaacccaactgtctt-3'

SEQ ID NO: 61 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha M$ : 5'-gatcggctaagagaaggacaga-3'

55 SEQ ID NO: 62 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha M$ : 5'-cattgccacaattcttctcaaa-3'

SEQ ID NO: 63 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha X$ : 5'-ccaacatctgcctttacattga-3'

SEQ ID NO: 64 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha X$ : 5'-cgtgaagtatctctgagcatcg-3'

60 SEQ ID NO: 65 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha D$ : 5'-ttaaccagatgaagggctttgt-3'

SEQ ID NO: 66 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha D$ : 5'-ggtctttgtacttctgccatc-3'

65 SEQ ID NO: 67 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\alpha 11b$ : 5'-gaaaagactgaggaggctgaga-3'

SEQ ID NO: 68 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\alpha 11b$ : 5'-

## ES 2 763 433 T3

gagaaaaatccgcaactggag-3'  
SEQ ID NO: 69 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\beta$ 1: 5'-gctgaagactatcccattgacc-3'  
5 SEQ ID NO: 70 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\beta$ 1: 5'-attccagatcgctgtgtttt-3'  
SEQ ID NO: 71 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\beta$ 2: 5'-tgatggacctctcactccat-3'  
SEQ ID NO: 72 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\beta$ 2: 5'-gaaactggttgagtggtgtgt-3'  
10 SEQ ID NO: 73 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\beta$ 3: 5'-tgtttaccactgatgccaagac-3'  
SEQ ID NO: 74 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\beta$ 3: 5'-tccataagcatcaacaatgag-3'  
SEQ ID NO: 75 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\beta$ 4: 5'-gcttcacacctattccctgtc-3'  
15 SEQ ID NO: 76 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\beta$ 4: 5'-gaaggaaggtttcagatgag-3'  
SEQ ID NO: 77 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\beta$ 5: 5'-gctggtgttcacaacagatgat-3'  
SEQ ID NO: 78 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\beta$ 5: 5'-atcccagactgacaactccact-3'  
20 SEQ ID NO: 79 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\beta$ 6: 5'-tgtgactgtggtgaatgtgtgt-3'  
SEQ ID NO: 80 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\beta$ 6: 5'-caccagctagttgcactgtc-3'  
SEQ ID NO: 81 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\beta$ 7: 5'-cacttcagacgacacattccat-3'  
25 SEQ ID NO: 82 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\beta$ 7: 5'-cccactgcagacttaggaatc-3'  
SEQ ID NO: 83 secuencia de cebador de sentido directo de la cadena de integrina  $\beta$ 8: 5'-gcattatgtcgaccaaactca-3'  
30 SEQ ID NO: 84 secuencia de cebador de sentido contrario de la cadena de integrina  $\beta$ 8: 5'-atttctcaggcttctcacgtc-3'  
SEQ ID NO: 85 GAPDH-F: GAGTCAACGGATTTGGTCGT  
SEQ ID NO: 86 GAPDH-R: TTGATTTTGGAGGGATCTCG

### LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Kyoto Prefectural Public University corporation  
The Doshisha  
Senju Pharmaceutical Co., Ltd.  
<120> Aplicación de laminina a cultivos de células endoteliales de la córnea  
<130> DS010PCT  
40 <150> JP2013-244972  
<151> 27/11/2013  
<160> 86  
<170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
45 <211> 11445  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 1

ES 2 763 433 T3

agaccgccg ggctcccgc gcgcgcgctg tccctggagc tcggggacgc ggcccggagc	60
cgggaagatg gcgaagcggc tctgcgcggg gagcgcaactg tgtgttcgcg gccccgggg	120
ccccgcgccg ctgctgctgg tcgggctggc gctgctgggc gcggcgcggg cgcgggagga	180
ggcggcgggc ggcttcagcc tgcaccgcc ctacttcaac ctggccgagg gcgcccgcac	240
cggcgctcc gcgacctgc gagaggaggc cccggcgcg gcctcccgc gcccaccga	300
ggacctttac tgcaagctgg tagggggccc cgtggccggc ggcgaccca accagaccat	360
ccggggccag tactgtgaca tctgcacggc tgccaacagc aacaaggcac accccgcgag	420
caatgccatc gatggcacgg agcgtggtg gcagagtcca ccgctgtccc gcggcctgga	480
gtacaacgag gtcaactca cctggacct gggccagtc ttccacgtgg cctacgtcct	540
catcaagttt gccaaactcac cccggccgga cctctgggtg ctggagcggc ccatggactt	600
cggccgcacc taccagcct ggcaattctt tgctctctcc aagagggact gtctggagcg	660
gttcgggcca cagacgctgg agcgcacac acgggacgac gcggccatct gcaccaccga	720
gtactcacgc atcgtgcccc tggagaacgg agagatcgtg gtgtccctgg tgaacggacg	780
tccggcgcc atgaatttct cctactcgcc gctgctacgt gagttacca aggccaccaa	840
cgtccgcctg cgcttcctgc gtaccaacac gctgctgggc catctcatgg ggaaggcgt	900
gcgggacccc acggtcacc gccggtatta ttacagcatc aaggatatca gcatcggagg	960
ccgctgtgtc tgccacggcc acgggatgc ctgcgatgcc aaagaccca cggaccggt	1020
caggctgcag tgcacctgcc agcacaacac ctgcgggggc acctgcgacc gctgctgccc	1080

ES 2 763 433 T3

cggcttcaat cagcagccgt ggaagcctgc gactgccaac agtgccaac agtgccagtc 1140  
 ctgtaactgc tacggccatg ccaccgactg ttactacgac cctgaggtgg accggcgccg 1200  
 cgccagccag agcctggatg gcacctatca gggtgggggg gtctgtatcg actgccagca 1260  
 ccacaccacc ggcgtaact gtgagcgtg cctgcccggc ttctaccgct ctccaacca 1320  
 ccctctcgac tcgccccacg tctgcccgcg ctgcaactgc gagtccgact tcacggatgg 1380  
 cacctgcgag gacctgacgg gtcgatgcta ctgccggccc aacttctctg gggagcggtg 1440  
 tgacgtgtgt gccgagggct tcacgggctt cccaagctgc taccgacgc cctcgtcctc 1500  
 caatgacacc agggagcagg tgctgccagc cggccagatt gtgaattgtg actgcagcgc 1560  
 ggcagggacc cagggcaacg cctgccggaa ggaccaagg gtgggacgct gtctgtgcaa 1620  
 acccaacttc caaggcacc attgtgagct ctgcgcgcca gggttctac gccccggctg 1680  
 ccagccctgc cagtgttcca gccctggagt ggccgatgac cgctgtgacc ctgacacagg 1740  
 ccagtgcagg tgccgagtgg gcttcgaggg ggccacatgt gatcgtgtg cccccggcta 1800  
 cttcacttc cctctctgcc agttgtgtgg ctgcagccct gcaggaacct tgcccagggg 1860  
 ctgcgatgag gccggccgct gcctatgcca gccctgagttt gctggacctc attgtgaccg 1920  
 gtgcgccctt ggctaccatg gttccccaa ctgccaagca tgcacctgcg acctcgggg 1980  
 agccctggac cagctctgtg gggcgggagg tttgtgccgc tgccgccccg gctacacagg 2040  
 cactgcctgc caggaatgca gccccggctt tcacggcttc cccagctgtg tcccctgcca 2100  
 ctgctctgct gaaggctccc tgacgcagc ctgtgacccc cggagtgggc agtgacagctg 2160  
 ccggccccgt gtgacggggc tgcggtgtga cacatgtgtg cccggtgcct acaacttccc 2220  
 ctactcgaa gctggctctt gccaccctgc cggctcggcc ccagtggatc ctgcccttcc 2280  
 tgaggcacag gttccctgta tgtgccgggc tcacgtggag gggccgagct gtgaccgctg 2340  
 caaacctggg ttctggggac tgagccccag caaccccag ggctgtacct gctgcagctg 2400  
 cgacctcagg ggcacactgg gtggagtgc tgagtgccag ccgggcaccg gccagtgtt 2460  
 ctgcaagccc cacgtgtgcg gccaggcctg cgcgtcctgc aaggatggct tctttggact 2520  
 ggatcaggct gactattttg gctgccgag ctgccggtgt gacattggcg gtgcactggg 2580  
 ccagagctgt gaaccgagga cggcgctctg ccggtgccgc cccaacacc aggccccac 2640  
 ctgcagcgag cctgcgaggg accactacct cccggacctg caccacctgc gcctggagct 2700  
 ggaggaggct gccacacctg agggtcacgc cgtgcgcttt ggcttcaacc ccctcgagtt 2760  
 cgagaacttc agctggaggg gctacgcgca gatggcacct gtccagcca ggatcgtggc 2820  
 caggctgaac ctgacctccc ctgaccttt ctggctcgtc ttccgatac tcaaccgggg 2880

ES 2 763 433 T3

ggccatgagt gtgagcgggc gggctctctgt gogagaggag ggcaggtcgg ccacctgcgc 2940  
 caactgcaca gcacagagtc agcccgtggc cttcccaccc agcacggagc ctgccttcat 3000  
 caccgtgccc cagaggggct tcggagagcc ctttgtgtg aaccctggca cctgggcctt 3060  
 gcgtgtggag gccgaagggg tgctcctgga ctacgtggtt ctgctgccta gcgcatacta 3120  
 ogaggcggcg ctctgcagc tgcgggtgac tgaggcctgc acataccgtc cctctgocca 3180  
 gcagtctggc gacaactgcc tcctctacac acacctcccc ctggatggct tcccctcggc 3240  
 cgccgggctg gaggccctgt gtcgccagga caacagcctg ccccgccctt gccccacgga 3300  
 gcagctcagc ccgtcgcacc cgccactgat cacctgcacg ggcagtgatg tggacgtcca 3360  
 gcttcaagtg gcagtgccac agccaggccg ctatgcccta gtggtggagt acgccaatga 3420  
 ggatgcccgc caggaggtgg gcgtggccgt gcacaccca cagcgggccc cccagcaggg 3480  
 gctgctctcc ctgcaccctt gcctgtacag caccctgtgc cggggcactg cccgggatac 3540  
 ccaggaccac ctggctgtct tccacctgga ctcggaggcc agcgtgaggc tcacagccga 3600  
 acaggcacgc ttcttctgc acggggtcac tctggtgccc attgaggagt tcagcccgga 3660  
 gttcgtggag ccccggtca gctgcatcag cagccacggc gcctttggcc ccaacagtgc 3720  
 cgctgtctg ccctcgcgt tcccaaagcc gcccagccc atcatcctca gggactgcca 3780  
 ggtgatcccg ctgcgcccg gcctcccgt gaccacogc caggatctca ctccagccat 3840  
 gtccccagct ggaccccgac ctcggcccc caccgctgtg gaccctgatg cagagcccac 3900  
 cctgctcgtg gagccccagg ccaccgtggt cttaccacco catgtgccc ogctgggccc 3960  
 ctatgccttc ctgtgcacg gctaccagcc agcccacccc accttcccc tggaagtctt 4020  
 catcaacgcc ggccgcgtgt ggcagggcca cgccaacgcc agcttctgtc cacatggcta 4080  
 cggctgccgc accctggtgg tgtgtgaggg ccaggccctg ctggacgtga cccacagcga 4140  
 gctcactgtg accgtgcgtg tgcccaaggg ccggtggctc tggttgatt atgtactcgt 4200  
 ggtccctgag aacgtctaca gctttggcta cctccgggag gagcccctgg ataatccta 4260  
 tgacttcato agccactgcg cagcccaggc ctaccacatc agcccagca gctcatccct 4320  
 gttctgcoga aacgtcgtg cttccctctc cctcttctat aacaacggag cccgtccatg 4380  
 tggctgccac gaagttagtg ctacaggccc cacgtgtgag cccttcgggg gccagtgtcc 4440  
 ctgccatgcc catgtcattg gccgtgactg ctcccgtgt gccaccgat actggggctt 4500  
 ccccaactgc aggcctgtg actgcgggtc ccgctctgt gacgagctca cgggccagtg 4560  
 catctgcccg ccacgcacca tccgcccga ctgcctgctg tgccagcccc agacctttgg 4620

ES 2 763 433 T3

ctgccacccc ctggtcggct gtgaggagt taactgctca gggcccggca tccaggagct 4680  
cacagaccct acctgtgaca cagacagcgg ccagtgcag tgcagacca acgtgactgg 4740  
gocccgctgt gatacctgt ctccgggctt ccatggctac ccccgtgcc gccctgtga 4800  
ctgtcacgag gcgggcactg cgcctggcgt gtgtgacccc ctcacagggc agtgtactg 4860  
taaggagaac gtgcagggcc ccaaagtga ccagtgcagc cttgggacct tctcactgga 4920  
tgctgccaac cccaaagggt gcacccgtg cttctgcttt ggggccacgg agcgtgccg 4980  
gagctcgtcc tacacccgcc aggagtctgt ggatatggag ggatgggtgc tgctgagcac 5040  
tgaccggcag gtggtgcccc acgagcggca gccagggacg gagatgctcc gtgcagacct 5100  
gcggcacgtg cctgaggctg tgcccaggc tttccccgag ctgtactggc aggccccacc 5160  
ctctacctg ggggaccggg tgtatccta cggtaggacc ctccgttatg aactgactc 5220  
agagaccag cggggagatg tctttgtccc catggagagc aggcgggatg tgggtctgca 5280  
gggcaaccag atgagcatca cattcctgga gcggcatac cccacgcctg gccacgttca 5340  
ccgtgggcag ctgcagctgg tggaggggaa cttccggcat acggagacgc gcaacactgt 5400  
gtcccgcgag gagctcatga tgggtctggc cagcctggag cagctgcaga tccgtgccct 5460  
cttctcacag atctcctcgg ctgtcttctt cgcagggtg gcaactggagg tggccagccc 5520  
agcaggccag ggggcccctgg ccagcaatgt ggagctgtgc ctgtgcccog ccagctaccg 5580  
gggggactca tgccaggaat gtgccccgg cttctatcgg gacgtcaaag gtctcttct 5640  
ggcccgatgt gtcccctgtc agtgccatgg aactcagac cgctgcctcc ctggctctgg 5700  
cgtctgtgtg gactgccagc acaacaccga aggggcccac tgtgagcgt gccaggctgg 5760  
cttctgtgac agcagggacg accccagcgc cccctgtgtc agctgcccct gcccctctc 5820  
agtgccttcc aacaacttgc ccgagggtg tgtcctgca ggcggccgca cccagtgcct 5880  
ctgcaaacct ggttatgcag gtgcctcctg cgagcgggtg gcgccggat tctttgggaa 5940  
cccactggtg ctgggcagct cctgccagcc atgcgactgc agoggcaacg gtgaccccaa 6000  
cttctcttc agcactgag accccctgac gggcgcctgc cgtggctgcc tgcgccacac 6060  
cactgggccc cgtgcgaga tctgtgcccc cggcttctac ggcaacgccc tgotgcccgg 6120  
caactgcacc cgtgagact gtacccatg tgggacagag gcctgcgacc cccacagcgg 6180  
gcaactgcctg tgcaaggcgg gogtactgg gcggcgtgt gaccgctgcc aggagggaca 6240  
ttttggtttc gatggctcgc ggggctgcc cccgtgtgct tgtggaccgg ccgccgaggg 6300  
ctccgagtgc cccccaga gcggacagt ccaactgccga ccagggacca tgggacccca 6360  
gtcccgagc tgtgcccctg gctactgggg gctccctgag cagggtgca ggcgctgcca 6420

ES 2 763 433 T3

gtgccctggg ggccgctgtg accctcacac gggccgctgc aactgcccc oggggctcag 6480  
 cggggagcgc tgcgacacct gcagccagca gcatcagggtg cctgttccag gcgggcctgt 6540  
 gggccacagc atccactgtg aagtgtgtga cactgtgtg gtctgtctcc tggatgacct 6600  
 ggaacgggcc ggcgccctcc tccccccat tcacgagcaa ctgctggca tcaatgccag 6660  
 ctccatggcc tgggcccgtc tgcacaggct gaacgcctcc atcgtgacc tgcagagcca 6720  
 gctccggagc cccctgggcc cccgccatga gacggcacag cagctggagg tgctggagca 6780  
 gcagagcaca agcctcgggc aggacgcacg gcggctaggc ggcagggccg tggggaccgg 6840  
 agaccaggcg agccaattgc tggccggcac cgaggccaca ctgggcatg cgaagacgct 6900  
 gttggggcc atccgggctg tggaccgcac cctgagcgag ctcatgtccc agacgggcca 6960  
 cctggggctg gccaatgcct cggctccatc aggtgagcag ctgctccgga cactggccga 7020  
 ggtggagcgg ctgctctggg agatgcgggc ccgggacctg ggggccccgc aggcagcagc 7080  
 tgaggctgag ttggctgcag cacagagatt gctggcccgg gtgcaggagc agctgagcag 7140  
 cctctgggag gagaaccagg cactggccac acaaaccgc gaccggctgg cccagcacga 7200  
 ggccggcctc atggacctgc gagaggcttt gaaccgggca gtggacgcca cacgggaggc 7260  
 ccaggagctc aacagccgca accaggagcg cctggaggaa gccctgcaa ggaagcagga 7320  
 gctgtcccgg gacaatgcc aacctcaggc cactctgcat gcggctaggg acacctggc 7380  
 cagcgtcttc agattgtgc acagcctgga ccaggctaag gaggagctgg agcgcctcgc 7440  
 ccccagcctg gacggggctc ggaccccact gctgcagagg atgcagacct tctccccgc 7500  
 gggcagcaag ctgctctag tggaggccgc cgaggccac gcacagcagc tgggcccagct 7560  
 ggcactcaat ctgtccagca tcattctgga cgtcaaccag gaccgcctca cccagagggc 7620  
 catcgaggcc tccaacgcct acagccgat cctgcaggcc gtgcaggctg ccgaggatgc 7680  
 tgctggccag gccctgcagc aggcggacca cacgtgggcg acggtggtgc ggcaggcct 7740  
 ggtggaccga gccagcagc tcctggccaa cagcactgca ctagaagagg ccatgctcca 7800  
 ggaacagcag aggctgggcc ttgtgtgggc tgccctccag ggtgocagga cccagctccg 7860  
 agatgtccgg gccaagaagg accagctgga ggocacatc caggcggcgc aggccatgct 7920  
 tgccatggac acagacgaga caagcaagaa gatcgacat gccaaaggctg tggctgtga 7980  
 agcccaggac accgccacc gtgtgcagtc ccagctgcag gccatgcagg agaatgtgga 8040  
 gcggtggcag ggccagtac agggcctgcg gggccaggac ctgggcccagg cagtgttga 8100  
 cgcaggccac tcagtgtcca ccctggagaa gacgctgcc cagctgctgg ccaagctgag 8160

ES 2 763 433 T3

catcctggag aaccgtgggg tgcacaacgc cagcctggcc ctgtccgcca gcattggcog 8220  
 cgtgcgagag ctattgccc aggccgggg ggctgccagt aaggtaagg tgcccatgaa 8280  
 gttcaacggg cgtcagggg tgcagctgog caccacacgg gatottgccc accttgctgc 8340  
 ctacactgcc ctcaagtct acctgcaggg cccagagcct gagcctgggc agggataccga 8400  
 ggatcgcttt gtgatgtaca tgggcagccg ccaggccact ggggactaca tgggtgtgtc 8460  
 tctgcgtgac aagaaggtgc actgggtgta tcagctgggt gaggcgggccc ctgcagtcct 8520  
 aagcatcgat gaggacattg gggagcagtt cgcagctgtc agcctggaca ggactctcca 8580  
 gtttgccac atgtccgtca cagtggagag acagatgatc caggaaacca agggatgacac 8640  
 ggtggcccct ggggcagagg ggctgctcaa cctgcggcca gacgacttcg tcttctactg 8700  
 cggggggtac cccagtacct tcaagcccc tcccctgctt cgcttccccg gctaccgggg 8760  
 ctgcatcgag atggacacgc tgaatgagga ggtggtcagc ctctacaact tcgagaggac 8820  
 ctccagctg gacacggctg tggacaggcc ttgtgcccgc tccaagtoga ccggggaccc 8880  
 gtggctcacg gacggctcct acctggacgg caccggcttc gcccgatca gcttcgacag 8940  
 tcagatcagc accaccaagc gcttcgagca ggagctgcgg ctctgtctct acagcggggt 9000  
 gctcttcttc ctgaagcagc agagccagtt cctgtgcttg gccgtgcaag aaggcagcct 9060  
 cgtgctgttg tatgactttg gggctggcct gaaaaaggcc gtcccactgc agccccacc 9120  
 gccctgacc tcggccagca aggcgatcca ggtgttcctg ctggggggca gccgcaagcg 9180  
 tgtgctggtg cgtgtggagc gggccacggt gtacagctg gagcaggaca atgatctgga 9240  
 gctggccgac gcctactacc tggggggcgt gccgcccagc cagctgcccc cgagcctgog 9300  
 acggctcttc cccaccggag gctcagtcog tggctgctc aaaggcatca aggcctggg 9360  
 caagtatgtg gacctcaagc ggtgaacac gacaggcgtg agcggcggct gcaccgccga 9420  
 cctgctggtg gggcgcgcca tgaacttcca tggccacgga ttcttcgccc tggcgtctc 9480  
 gaacgtggca ccgctcactg gcaacgtcta ctccggcttc ggcttcaca gcgcccagga 9540  
 cagtgcctg ctctactacc gggcgtcccc ggatgggcta tgccaggtgt ccctgcagca 9600  
 gggcgtgtg agcctacagc tctgaggac tgaagtgaaa actcaagcgg gcttcgccga 9660  
 tggtgcccc cattacgtcg cttctacag caatgccagc ggagtctgac tgtatgtcga 9720  
 tgaccagctc cagcagatga agccccaccg gggaccacc cccgagctcc agccgcagcc 9780  
 tgaggggccc ccgaggctcc tctgggagg cctgcctgag tctggcacca tttaactt 9840  
 cagtggctgc atcagcaacg tctctgtgca gcggctcctg ggcccacagc gcgtatttga 9900  
 tctgcagcag aacctgggca gcgtcaatgt gagcacgggc tgtgcacccg ccctgcaagc 9960

ES 2 763 433 T3

ccagaccccc ggccctggggc ctagaggact gcaggccacc gcccggaagg cctcccccg 10020  
cagccgtcag cccgcccggc atcctgcctg catgctgcc ccacacctca ggaccacccg 10080  
agactcctac cagtttgggg gticcctgtc cagtcacctg gagtttgtgg gcatcctggc 10140  
ccgacatagg aactggccca gtctctccat gcacgtcctc ccgogaagct cccgaggcct 10200  
cctcctcttc actgcccgtc tgaggcccgg cagcccctcc ctggcgtct tctgagcaa 10260  
tggccacttc gttgcacaga tggaaggcct cgggactcgg ctccgcgcc agagccgcca 10320  
gcgctcccgg cctggccgct ggcacaaggt ctccgtgcgc tgggagaaga accggatcct 10380  
gctggtgacg gacggggccc gggcctggag ccaggagggg ccgcaccggc agcaccaggg 10440  
ggcagagcac ccccagcccc acaccctctt tgtgggcggc ctccggcca gcagccacag 10500  
ctccaaactt ccggtgaccg tcgggttcag oggctgtgtg aagagactga ggctgcacgg 10560  
gaggcccctg gggccccca cacggatggc aggggtcaca ccctgcatct tggccccct 10620  
ggaggcgggc ctgttcttc caggcagcgg gggagttatc actttagacc tcccaggagc 10680  
tacactgcct gatgtgggcc tggaactgga ggtgcggccc ctggcagtca ccggactgat 10740  
cttccacttg gccagggccc ggacgcccc ctacttgag ttgcaggtga ccgagaagca 10800  
agtctgctg cggcgggatg acggagcagg ggagttctcc acgtcagtga cccgccctc 10860  
agtgctgtgt gatggccagt ggcaccggct agcggtgatg aaaagcggga atgtgctccg 10920  
gctggaggtg gacgcgcaga gcaaccacac cgtgggcccc ttgctggcgg ctgcagctgg 10980  
tgcccagoc cctctgtacc tcgggggcct gcctgagccc atggccgtgc agccctggcc 11040  
ccccgcctac tgcggctgca tgaggaggct ggcggtgaac cggcccccg tcgcatgac 11100  
tcgctctgtg gaggccacg gggcagtggg ggccagtggc tgcccagccg cctaggacac 11160  
agccaacccc gggccctggt caggcccctg cagctgcctc acaccgccc ttgtgctcgc 11220  
ctcataggtg tctatttga ctctaagctc tacgggtgac agatcttgtt tctgaagatg 11280  
gtttaagtta tagcttctta aacgaaagaa taaaatactg caaaatgttt ttatatttgg 11340  
cccttcacc catttttaat tgtgagagat ttgtcaccaa tcatcactgg ttctcctta 11400  
aaaattaa agtaacttct gtgtaaccga aaaaaaaaa aaaaa 11445

<210> 2  
<211> 3695  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 2

5

ES 2 763 433 T3

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

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

Ala Arg Ala Arg Glu Glu Ala Gly Gly Gly Phe Ser Leu His Pro Pro  
 35 40 45

Tyr Phe Asn Leu Ala Glu Gly Ala Arg Ile Ala Ala Ser Ala Thr Cys  
 50 55 60

Gly Glu Glu Ala Pro Ala Arg Gly Ser Pro Arg Pro Thr Glu Asp Leu  
 65 70 75 80

Tyr Cys Lys Leu Val Gly Gly Pro Val Ala Gly Gly Asp Pro Asn Gln  
 85 90 95

Thr Ile Arg Gly Gln Tyr Cys Asp Ile Cys Thr Ala Ala Asn Ser Asn  
 100 105 110

Lys Ala His Pro Ala Ser Asn Ala Ile Asp Gly Thr Glu Arg Trp Trp  
 115 120 125

Gln Ser Pro Pro Leu Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Asn Glu Val Asn Val  
 130 135 140

Thr Leu Asp Leu Gly Gln Val Phe His Val Ala Tyr Val Leu Ile Lys  
 145 150 155 160

Phe Ala Asn Ser Pro Arg Pro Asp Leu Trp Val Leu Glu Arg Ser Met  
 165 170 175

Asp Phe Gly Arg Thr Tyr Gln Pro Trp Gln Phe Phe Ala Ser Ser Lys  
 180 185 190

Arg Asp Cys Leu Glu Arg Phe Gly Pro Gln Thr Leu Glu Arg Ile Thr  
 195 200 205

Arg Asp Asp Ala Ala Ile Cys Thr Thr Glu Tyr Ser Arg Ile Val Pro  
 210 215 220

Leu Glu Asn Gly Glu Ile Val Val Ser Leu Val Asn Gly Arg Pro Gly  
 225 230 235 240

ES 2 763 433 T3

Ala Met Asn Phe Ser Tyr Ser Pro Leu Leu Arg Glu Phe Thr Lys Ala  
 245 250 255

Thr Asn Val Arg Leu Arg Phe Leu Arg Thr Asn Thr Leu Leu Gly His  
 260 265 270

Leu Met Gly Lys Ala Leu Arg Asp Pro Thr Val Thr Arg Arg Tyr Tyr  
 275 280 285

Tyr Ser Ile Lys Asp Ile Ser Ile Gly Gly Arg Cys Val Cys His Gly  
 290 295 300

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

Gln Cys Thr Cys Gln His Asn Thr Cys Gly Gly Thr Cys Asp Arg Cys  
 325 330 335

Cys Pro Gly Phe Asn Gln Gln Pro Trp Lys Pro Ala Thr Ala Asn Ser  
 340 345 350

Ala Asn Glu Cys Gln Ser Cys Asn Cys Tyr Gly His Ala Thr Asp Cys  
 355 360 365

Tyr Tyr Asp Pro Glu Val Asp Arg Arg Arg Ala Ser Gln Ser Leu Asp  
 370 375 380

Gly Thr Tyr Gln Gly Gly Gly Val Cys Ile Asp Cys Gln His His Thr  
 385 390 395 400

Thr Gly Val Asn Cys Glu Arg Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Ser Pro  
 405 410 415

Asn His Pro Leu Asp Ser Pro His Val Cys Arg Arg Cys Asn Cys Glu  
 420 425 430

Ser Asp Phe Thr Asp Gly Thr Cys Glu Asp Leu Thr Gly Arg Cys Tyr  
 435 440 445

Cys Arg Pro Asn Phe Ser Gly Glu Arg Cys Asp Val Cys Ala Glu Gly  
 450 455 460

Phe Thr Gly Phe Pro Ser Cys Tyr Pro Thr Pro Ser Ser Ser Asn Asp  
 465 470 475 480

ES 2 763 433 T3

Thr Arg Glu Gln Val Leu Pro Ala Gly Gln Ile Val Asn Cys Asp Cys  
 485 490 495

Ser Ala Ala Gly Thr Gln Gly Asn Ala Cys Arg Lys Asp Pro Arg Val  
 500 505 510

Gly Arg Cys Leu Cys Lys Pro Asn Phe Gln Gly Thr His Cys Glu Leu  
 515 520 525

Cys Ala Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Gly Cys Gln Pro Cys Gln Cys Ser  
 530 535 540

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

Arg Cys Arg Val Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Asp Arg Cys Ala Pro  
 565 570 575

Gly Tyr Phe His Phe Pro Leu Cys Gln Leu Cys Gly Cys Ser Pro Ala  
 580 585 590

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

Pro Glu Phe Ala Gly Pro His Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Tyr His  
 610 615 620

Gly Phe Pro Asn Cys Gln Ala Cys Thr Cys Asp Pro Arg Gly Ala Leu  
 625 630 635 640

Asp Gln Leu Cys Gly Ala Gly Gly Leu Cys Arg Cys Arg Pro Gly Tyr  
 645 650 655

Thr Gly Thr Ala Cys Gln Glu Cys Ser Pro Gly Phe His Gly Phe Pro  
 660 665 670

Ser Cys Val Pro Cys His Cys Ser Ala Glu Gly Ser Leu His Ala Ala  
 675 680 685

Cys Asp Pro Arg Ser Gly Gln Cys Ser Cys Arg Pro Arg Val Thr Gly  
 690 695 700

Leu Arg Cys Asp Thr Cys Val Pro Gly Ala Tyr Asn Phe Pro Tyr Cys



ES 2 763 433 T3

Arg Val Ser Val Arg Glu Glu Gly Arg Ser Ala Thr Cys Ala Asn Cys  
 945 950 955 960

Thr Ala Gln Ser Gln Pro Val Ala Phe Pro Pro Ser Thr Glu Pro Ala  
 965 970 975

Phe Ile Thr Val Pro Gln Arg Gly Phe Gly Glu Pro Phe Val Leu Asn  
 980 985 990

Pro Gly Thr Trp Ala Leu Arg Val Glu Ala Glu Gly Val Leu Leu Asp  
 995 1000 1005

Tyr Val Val Leu Leu Pro Ser Ala Tyr Tyr Glu Ala Ala Leu Leu  
 1010 1015 1020

Gln Leu Arg Val Thr Glu Ala Cys Thr Tyr Arg Pro Ser Ala Gln  
 1025 1030 1035

Gln Ser Gly Asp Asn Cys Leu Leu Tyr Thr His Leu Pro Leu Asp  
 1040 1045 1050

Gly Phe Pro Ser Ala Ala Gly Leu Glu Ala Leu Cys Arg Gln Asp  
 1055 1060 1065

Asn Ser Leu Pro Arg Pro Cys Pro Thr Glu Gln Leu Ser Pro Ser  
 1070 1075 1080

His Pro Pro Leu Ile Thr Cys Thr Gly Ser Asp Val Asp Val Gln  
 1085 1090 1095

Leu Gln Val Ala Val Pro Gln Pro Gly Arg Tyr Ala Leu Val Val  
 1100 1105 1110

Glu Tyr Ala Asn Glu Asp Ala Arg Gln Glu Val Gly Val Ala Val  
 1115 1120 1125

His Thr Pro Gln Arg Ala Pro Gln Gln Gly Leu Leu Ser Leu His  
 1130 1135 1140

Pro Cys Leu Tyr Ser Thr Leu Cys Arg Gly Thr Ala Arg Asp Thr  
 1145 1150 1155

Gln Asp His Leu Ala Val Phe His Leu Asp Ser Glu Ala Ser Val  
 1160 1165 1170

ES 2 763 433 T3

Arg Leu Thr Ala Glu Gln Ala Arg Phe Phe Leu His Gly Val Thr  
1175 1180 1185

Leu Val Pro Ile Glu Glu Phe Ser Pro Glu Phe Val Glu Pro Arg  
1190 1195 1200

Val Ser Cys Ile Ser Ser His Gly Ala Phe Gly Pro Asn Ser Ala  
1205 1210 1215

Ala Cys Leu Pro Ser Arg Phe Pro Lys Pro Pro Gln Pro Ile Ile  
1220 1225 1230

Leu Arg Asp Cys Gln Val Ile Pro Leu Pro Pro Gly Leu Pro Leu  
1235 1240 1245

Thr His Ala Gln Asp Leu Thr Pro Ala Met Ser Pro Ala Gly Pro  
1250 1255 1260

Arg Pro Arg Pro Pro Thr Ala Val Asp Pro Asp Ala Glu Pro Thr  
1265 1270 1275

Leu Leu Arg Glu Pro Gln Ala Thr Val Val Phe Thr Thr His Val  
1280 1285 1290

Pro Thr Leu Gly Arg Tyr Ala Phe Leu Leu His Gly Tyr Gln Pro  
1295 1300 1305

Ala His Pro Thr Phe Pro Val Glu Val Leu Ile Asn Ala Gly Arg  
1310 1315 1320

Val Trp Gln Gly His Ala Asn Ala Ser Phe Cys Pro His Gly Tyr  
1325 1330 1335

Gly Cys Arg Thr Leu Val Val Cys Glu Gly Gln Ala Leu Leu Asp  
1340 1345 1350

Val Thr His Ser Glu Leu Thr Val Thr Val Arg Val Pro Lys Gly  
1355 1360 1365

Arg Trp Leu Trp Leu Asp Tyr Val Leu Val Val Pro Glu Asn Val  
1370 1375 1380

Tyr Ser Phe Gly Tyr Leu Arg Glu Glu Pro Leu Asp Lys Ser Tyr  
1385 1390 1395

ES 2 763 433 T3

Asp Phe Ile Ser His Cys Ala Ala Gln Gly Tyr His Ile Ser Pro  
 1400 1405 1410

Ser Ser Ser Ser Leu Phe Cys Arg Asn Ala Ala Ala Ser Leu Ser  
 1415 1420 1425

Leu Phe Tyr Asn Asn Gly Ala Arg Pro Cys Gly Cys His Glu Val  
 1430 1435 1440

Gly Ala Thr Gly Pro Thr Cys Glu Pro Phe Gly Gly Gln Cys Pro  
 1445 1450 1455

Cys His Ala His Val Ile Gly Arg Asp Cys Ser Arg Cys Ala Thr  
 1460 1465 1470

Gly Tyr Trp Gly Phe Pro Asn Cys Arg Pro Cys Asp Cys Gly Ala  
 1475 1480 1485

Arg Leu Cys Asp Glu Leu Thr Gly Gln Cys Ile Cys Pro Pro Arg  
 1490 1495 1500

Thr Ile Pro Pro Asp Cys Leu Leu Cys Gln Pro Gln Thr Phe Gly  
 1505 1510 1515

Cys His Pro Leu Val Gly Cys Glu Glu Cys Asn Cys Ser Gly Pro  
 1520 1525 1530

Gly Ile Gln Glu Leu Thr Asp Pro Thr Cys Asp Thr Asp Ser Gly  
 1535 1540 1545

Gln Cys Lys Cys Arg Pro Asn Val Thr Gly Arg Arg Cys Asp Thr  
 1550 1555 1560

Cys Ser Pro Gly Phe His Gly Tyr Pro Arg Cys Arg Pro Cys Asp  
 1565 1570 1575

Cys His Glu Ala Gly Thr Ala Pro Gly Val Cys Asp Pro Leu Thr  
 1580 1585 1590

Gly Gln Cys Tyr Cys Lys Glu Asn Val Gln Gly Pro Lys Cys Asp  
 1595 1600 1605

Gln Cys Ser Leu Gly Thr Phe Ser Leu Asp Ala Ala Asn Pro Lys

ES 2 763 433 T3

1610	1615	1620
Gly Cys Thr Arg Cys Phe Cys Phe Gly Ala Thr Glu Arg Cys Arg 1625 1630		1635
Ser Ser Ser Tyr Thr Arg Gln Glu Phe Val Asp Met Glu Gly Trp 1640 1645		1650
Val Leu Leu Ser Thr Asp Arg Gln Val Val Pro His Glu Arg Gln 1655 1660		1665
Pro Gly Thr Glu Met Leu Arg Ala Asp Leu Arg His Val Pro Glu 1670 1675		1680
Ala Val Pro Glu Ala Phe Pro Glu Leu Tyr Trp Gln Ala Pro Pro 1685 1690		1695
Ser Tyr Leu Gly Asp Arg Val Ser Ser Tyr Gly Gly Thr Leu Arg 1700 1705		1710
Tyr Glu Leu His Ser Glu Thr Gln Arg Gly Asp Val Phe Val Pro 1715 1720		1725
Met Glu Ser Arg Pro Asp Val Val Leu Gln Gly Asn Gln Met Ser 1730 1735		1740
Ile Thr Phe Leu Glu Pro Ala Tyr Pro Thr Pro Gly His Val His 1745 1750		1755
Arg Gly Gln Leu Gln Leu Val Glu Gly Asn Phe Arg His Thr Glu 1760 1765		1770
Thr Arg Asn Thr Val Ser Arg Glu Glu Leu Met Met Val Leu Ala 1775 1780		1785
Ser Leu Glu Gln Leu Gln Ile Arg Ala Leu Phe Ser Gln Ile Ser 1790 1795		1800
Ser Ala Val Phe Leu Arg Arg Val Ala Leu Glu Val Ala Ser Pro 1805 1810		1815
Ala Gly Gln Gly Ala Leu Ala Ser Asn Val Glu Leu Cys Leu Cys 1820 1825		1830

ES 2 763 433 T3

Pro Ala Ser Tyr Arg Gly Asp Ser Cys Gln Glu Cys Ala Pro Gly  
 1835 1840 1845

Phe Tyr Arg Asp Val Lys Gly Leu Phe Leu Gly Arg Cys Val Pro  
 1850 1855 1860

Cys Gln Cys His Gly His Ser Asp Arg Cys Leu Pro Gly Ser Gly  
 1865 1870 1875

Val Cys Val Asp Cys Gln His Asn Thr Glu Gly Ala His Cys Glu  
 1880 1885 1890

Arg Cys Gln Ala Gly Phe Val Ser Ser Arg Asp Asp Pro Ser Ala  
 1895 1900 1905

Pro Cys Val Ser Cys Pro Cys Pro Leu Ser Val Pro Ser Asn Asn  
 1910 1915 1920

Phe Ala Glu Gly Cys Val Leu Arg Gly Gly Arg Thr Gln Cys Leu  
 1925 1930 1935

Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Gly Ala Ser Cys Glu Arg Cys Ala Pro  
 1940 1945 1950

Gly Phe Phe Gly Asn Pro Leu Val Leu Gly Ser Ser Cys Gln Pro  
 1955 1960 1965

Cys Asp Cys Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Leu Leu Phe Ser Asp  
 1970 1975 1980

Cys Asp Pro Leu Thr Gly Ala Cys Arg Gly Cys Leu Arg His Thr  
 1985 1990 1995

Thr Gly Pro Arg Cys Glu Ile Cys Ala Pro Gly Phe Tyr Gly Asn  
 2000 2005 2010

Ala Leu Leu Pro Gly Asn Cys Thr Arg Cys Asp Cys Thr Pro Cys  
 2015 2020 2025

Gly Thr Glu Ala Cys Asp Pro His Ser Gly His Cys Leu Cys Lys  
 2030 2035 2040

Ala Gly Val Thr Gly Arg Arg Cys Asp Arg Cys Gln Glu Gly His  
 2045 2050 2055

ES 2 763 433 T3

Phe Gly Phe Asp Gly Cys Gly Gly Cys Arg Pro Cys Ala Cys Gly  
 2060 2065 2070

Pro Ala Ala Glu Gly Ser Glu Cys His Pro Gln Ser Gly Gln Cys  
 2075 2080 2085

His Cys Arg Pro Gly Thr Met Gly Pro Gln Cys Arg Glu Cys Ala  
 2090 2095 2100

Pro Gly Tyr Trp Gly Leu Pro Glu Gln Gly Cys Arg Arg Cys Gln  
 2105 2110 2115

Cys Pro Gly Gly Arg Cys Asp Pro His Thr Gly Arg Cys Asn Cys  
 2120 2125 2130

Pro Pro Gly Leu Ser Gly Glu Arg Cys Asp Thr Cys Ser Gln Gln  
 2135 2140 2145

His Gln Val Pro Val Pro Gly Gly Pro Val Gly His Ser Ile His  
 2150 2155 2160

Cys Glu Val Cys Asp His Cys Val Val Leu Leu Leu Asp Asp Leu  
 2165 2170 2175

Glu Arg Ala Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile His Glu Gln Leu Arg  
 2180 2185 2190

Gly Ile Asn Ala Ser Ser Met Ala Trp Ala Arg Leu His Arg Leu  
 2195 2200 2205

Asn Ala Ser Ile Ala Asp Leu Gln Ser Gln Leu Arg Ser Pro Leu  
 2210 2215 2220

Gly Pro Arg His Glu Thr Ala Gln Gln Leu Glu Val Leu Glu Gln  
 2225 2230 2235

Gln Ser Thr Ser Leu Gly Gln Asp Ala Arg Arg Leu Gly Gly Gln  
 2240 2245 2250

Ala Val Gly Thr Arg Asp Gln Ala Ser Gln Leu Leu Ala Gly Thr  
 2255 2260 2265

Glu Ala Thr Leu Gly His Ala Lys Thr Leu Leu Ala Ala Ile Arg  
 2270 2275 2280

ES 2 763 433 T3

Ala Val Asp Arg Thr Leu Ser Glu Leu Met Ser Gln Thr Gly His  
 2285 2290 2295

Leu Gly Leu Ala Asn Ala Ser Ala Pro Ser Gly Glu Gln Leu Leu  
 2300 2305 2310

Arg Thr Leu Ala Glu Val Glu Arg Leu Leu Trp Glu Met Arg Ala  
 2315 2320 2325

Arg Asp Leu Gly Ala Pro Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Leu Ala  
 2330 2335 2340

Ala Ala Gln Arg Leu Leu Ala Arg Val Gln Glu Gln Leu Ser Ser  
 2345 2350 2355

Leu Trp Glu Glu Asn Gln Ala Leu Ala Thr Gln Thr Arg Asp Arg  
 2360 2365 2370

Leu Ala Gln His Glu Ala Gly Leu Met Asp Leu Arg Glu Ala Leu  
 2375 2380 2385

Asn Arg Ala Val Asp Ala Thr Arg Glu Ala Gln Glu Leu Asn Ser  
 2390 2395 2400

Arg Asn Gln Glu Arg Leu Glu Glu Ala Leu Gln Arg Lys Gln Glu  
 2405 2410 2415

Leu Ser Arg Asp Asn Ala Thr Leu Gln Ala Thr Leu His Ala Ala  
 2420 2425 2430

Arg Asp Thr Leu Ala Ser Val Phe Arg Leu Leu His Ser Leu Asp  
 2435 2440 2445

Gln Ala Lys Glu Glu Leu Glu Arg Leu Ala Ala Ser Leu Asp Gly  
 2450 2455 2460

Ala Arg Thr Pro Leu Leu Gln Arg Met Gln Thr Phe Ser Pro Ala  
 2465 2470 2475

Gly Ser Lys Leu Arg Leu Val Glu Ala Ala Glu Ala His Ala Gln  
 2480 2485 2490

Gln Leu Gly Gln Leu Ala Leu Asn Leu Ser Ser Ile Ile Leu Asp

ES 2 763 433 T3

2495	2500	2505
Val Asn Gln Asp Arg Leu Thr	Gln Arg Ala Ile	Glu Ala Ser Asn
2510	2515	2520
Ala Tyr Ser Arg Ile Leu Gln	Ala Val Gln Ala	Ala Glu Asp Ala
2525	2530	2535
Ala Gly Gln Ala Leu Gln Gln	Ala Asp His Thr	Trp Ala Thr Val
2540	2545	2550
Val Arg Gln Gly Leu Val Asp	Arg Ala Gln Gln	Leu Leu Ala Asn
2555	2560	2565
Ser Thr Ala Leu Glu Glu Ala	Met Leu Gln Glu	Gln Gln Arg Leu
2570	2575	2580
Gly Leu Val Trp Ala Ala Leu	Gln Gly Ala Arg	Thr Gln Leu Arg
2585	2590	2595
Asp Val Arg Ala Lys Lys Asp	Gln Leu Glu Ala	His Ile Gln Ala
2600	2605	2610
Ala Gln Ala Met Leu Ala Met	Asp Thr Asp Glu	Thr Ser Lys Lys
2615	2620	2625
Ile Ala His Ala Lys Ala Val	Ala Ala Glu Ala	Gln Asp Thr Ala
2630	2635	2640
Thr Arg Val Gln Ser Gln Leu	Gln Ala Met Gln	Glu Asn Val Glu
2645	2650	2655
Arg Trp Gln Gly Gln Tyr Glu	Gly Leu Arg Gly	Gln Asp Leu Gly
2660	2665	2670
Gln Ala Val Leu Asp Ala Gly	His Ser Val Ser	Thr Leu Glu Lys
2675	2680	2685
Thr Leu Pro Gln Leu Leu Ala	Lys Leu Ser Ile	Leu Glu Asn Arg
2690	2695	2700
Gly Val His Asn Ala Ser Leu	Ala Leu Ser Ala	Ser Ile Gly Arg
2705	2710	2715

ES 2 763 433 T3

Val Arg Glu Leu Ile Ala Gln Ala Arg Gly Ala Ala Ser Lys Val  
 2720 2725 2730

Lys Val Pro Met Lys Phe Asn Gly Arg Ser Gly Val Gln Leu Arg  
 2735 2740 2745

Thr Pro Arg Asp Leu Ala Asp Leu Ala Ala Tyr Thr Ala Leu Lys  
 2750 2755 2760

Phe Tyr Leu Gln Gly Pro Glu Pro Glu Pro Gly Gln Gly Thr Glu  
 2765 2770 2775

Asp Arg Phe Val Met Tyr Met Gly Ser Arg Gln Ala Thr Gly Asp  
 2780 2785 2790

Tyr Met Gly Val Ser Leu Arg Asp Lys Lys Val His Trp Val Tyr  
 2795 2800 2805

Gln Leu Gly Glu Ala Gly Pro Ala Val Leu Ser Ile Asp Glu Asp  
 2810 2815 2820

Ile Gly Glu Gln Phe Ala Ala Val Ser Leu Asp Arg Thr Leu Gln  
 2825 2830 2835

Phe Gly His Met Ser Val Thr Val Glu Arg Gln Met Ile Gln Glu  
 2840 2845 2850

Thr Lys Gly Asp Thr Val Ala Pro Gly Ala Glu Gly Leu Leu Asn  
 2855 2860 2865

Leu Arg Pro Asp Asp Phe Val Phe Tyr Val Gly Gly Tyr Pro Ser  
 2870 2875 2880

Thr Phe Thr Pro Pro Pro Leu Leu Arg Phe Pro Gly Tyr Arg Gly  
 2885 2890 2895

Cys Ile Glu Met Asp Thr Leu Asn Glu Glu Val Val Ser Leu Tyr  
 2900 2905 2910

Asn Phe Glu Arg Thr Phe Gln Leu Asp Thr Ala Val Asp Arg Pro  
 2915 2920 2925

Cys Ala Arg Ser Lys Ser Thr Gly Asp Pro Trp Leu Thr Asp Gly  
 2930 2935 2940

ES 2 763 433 T3

Ser Tyr Leu Asp Gly Thr Gly Phe Ala Arg Ile Ser Phe Asp Ser  
 2945 2950 2955

Gln Ile Ser Thr Thr Lys Arg Phe Glu Gln Glu Leu Arg Leu Val  
 2960 2965 2970

Ser Tyr Ser Gly Val Leu Phe Phe Leu Lys Gln Gln Ser Gln Phe  
 2975 2980 2985

Leu Cys Leu Ala Val Gln Glu Gly Ser Leu Val Leu Leu Tyr Asp  
 2990 2995 3000

Phe Gly Ala Gly Leu Lys Lys Ala Val Pro Leu Gln Pro Pro Pro  
 3005 3010 3015

Pro Leu Thr Ser Ala Ser Lys Ala Ile Gln Val Phe Leu Leu Gly  
 3020 3025 3030

Gly Ser Arg Lys Arg Val Leu Val Arg Val Glu Arg Ala Thr Val  
 3035 3040 3045

Tyr Ser Val Glu Gln Asp Asn Asp Leu Glu Leu Ala Asp Ala Tyr  
 3050 3055 3060

Tyr Leu Gly Gly Val Pro Pro Asp Gln Leu Pro Pro Ser Leu Arg  
 3065 3070 3075

Arg Leu Phe Pro Thr Gly Gly Ser Val Arg Gly Cys Val Lys Gly  
 3080 3085 3090

Ile Lys Ala Leu Gly Lys Tyr Val Asp Leu Lys Arg Leu Asn Thr  
 3095 3100 3105

Thr Gly Val Ser Ala Gly Cys Thr Ala Asp Leu Leu Val Gly Arg  
 3110 3115 3120

Ala Met Thr Phe His Gly His Gly Phe Leu Arg Leu Ala Leu Ser  
 3125 3130 3135

Asn Val Ala Pro Leu Thr Gly Asn Val Tyr Ser Gly Phe Gly Phe  
 3140 3145 3150

His Ser Ala Gln Asp Ser Ala Leu Leu Tyr Tyr Arg Ala Ser Pro  
 3155 3160 3165

ES 2 763 433 T3

Asp Gly Leu Cys Gln Val Ser Leu Gln Gln Gly Arg Val Ser Leu  
 3170 3175 3180  
  
 Gln Leu Leu Arg Thr Glu Val Lys Thr Gln Ala Gly Phe Ala Asp  
 3185 3190 3195  
  
 Gly Ala Pro His Tyr Val Ala Phe Tyr Ser Asn Ala Thr Gly Val  
 3200 3205 3210  
  
 Trp Leu Tyr Val Asp Asp Gln Leu Gln Gln Met Lys Pro His Arg  
 3215 3220 3225  
  
 Gly Pro Pro Pro Glu Leu Gln Pro Gln Pro Glu Gly Pro Pro Arg  
 3230 3235 3240  
  
 Leu Leu Leu Gly Gly Leu Pro Glu Ser Gly Thr Ile Tyr Asn Phe  
 3245 3250 3255  
  
 Ser Gly Cys Ile Ser Asn Val Phe Val Gln Arg Leu Leu Gly Pro  
 3260 3265 3270  
  
 Gln Arg Val Phe Asp Leu Gln Gln Asn Leu Gly Ser Val Asn Val  
 3275 3280 3285  
  
 Ser Thr Gly Cys Ala Pro Ala Leu Gln Ala Gln Thr Pro Gly Leu  
 3290 3295 3300  
  
 Gly Pro Arg Gly Leu Gln Ala Thr Ala Arg Lys Ala Ser Arg Arg  
 3305 3310 3315  
  
 Ser Arg Gln Pro Ala Arg His Pro Ala Cys Met Leu Pro Pro His  
 3320 3325 3330  
  
 Leu Arg Thr Thr Arg Asp Ser Tyr Gln Phe Gly Gly Ser Leu Ser  
 3335 3340 3345  
  
 Ser His Leu Glu Phe Val Gly Ile Leu Ala Arg His Arg Asn Trp  
 3350 3355 3360  
  
 Pro Ser Leu Ser Met His Val Leu Pro Arg Ser Ser Arg Gly Leu  
 3365 3370 3375  
  
 Leu Leu Phe Thr Ala Arg Leu Arg Pro Gly Ser Pro Ser Leu Ala

ES 2 763 433 T3

3380		3385		3390
Leu Phe	Leu Ser	Asn Gly	His	Phe Val
3395			3400	Met
				Glu Gly Leu
				3405
Gly Thr	Arg Leu	Arg Ala	Gln	Ser Arg
3410			3415	Gln Arg
				Ser
				Arg Pro Gly
				3420
Arg Trp	His Lys	Val Ser	Val	Arg Trp
3425			3430	Glu Lys
				Asn
				Arg Ile Leu
				3435
Leu Val	Thr Asp	Gly Ala	Arg	Ala Trp
3440			3445	Ser Gln
				Glu
				Gly Pro His
				3450
Arg Gln	His Gln	Gly Ala	Glu	His Pro
3455			3460	Gln Pro
				His
				Thr Leu Phe
				3465
Val Gly	Gly Leu	Pro Ala	Ser	Ser His
3470			3475	Ser Ser
				Lys
				Leu Pro Val
				3480
Thr Val	Gly Phe	Ser Gly	Cys	Val Lys
3485			3490	Arg Leu
				Arg
				Leu His Gly
				3495
Arg Pro	Leu Gly	Ala Pro	Thr	Arg Met
3500			3505	Ala Gly
				Val
				Thr Pro Cys
				3510
Ile Leu	Gly Pro	Leu Glu	Ala	Gly Leu
3515			3520	Phe Phe
				Pro
				Gly Ser Gly
				3525
Gly Val	Ile Thr	Leu Asp	Leu	Pro Gly
3530			3535	Ala Thr
				Leu
				Pro Asp Val
				3540
Gly Leu	Glu Leu	Glu Val	Arg	Pro Leu
3545			3550	Ala Val
				Thr
				Gly Leu Ile
				3555
Phe His	Leu Gly	Gln Ala	Arg	Thr Pro
3560			3565	Pro Tyr
				Leu
				Gln Leu Gln
				3570
Val Thr	Glu Lys	Gln Val	Leu	Leu Arg
3575			3580	Ala Asp
				Asp
				Gly Ala Gly
				3585
Glu Phe	Ser Thr	Ser Val	Thr	Arg Pro
3590			3595	Ser Val
				Leu
				Cys Asp Gly
				3600

ES 2 763 433 T3

Gln Trp His Arg Leu Ala Val Met Lys Ser Gly Asn Val Leu Arg  
3605 3610 3615

Leu Glu Val Asp Ala Gln Ser Asn His Thr Val Gly Pro Leu Leu  
3620 3625 3630

Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Leu Gly Gly Leu  
3635 3640 3645

Pro Glu Pro Met Ala Val Gln Pro Trp Pro Pro Ala Tyr Cys Gly  
3650 3655 3660

Cys Met Arg Arg Leu Ala Val Asn Arg Ser Pro Val Ala Met Thr  
3665 3670 3675

Arg Ser Val Glu Val His Gly Ala Val Gly Ala Ser Gly Cys Pro  
3680 3685 3690

Ala Ala  
3695

<210> 3  
<211> 5866  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 3

5

ES 2 763 433 T3

gggacctgga agcgccccag ccccgacgag atcgagatt cggctttcaa acaaaagagg 60  
 cgccccgggg ggtgggaccg ggacctcacc cggctctcgc agagttgcgg ccgccccccc 120  
 cttcagcccc ggctctccgt atcgcatga gcagaggcgc ctccctctgt tcctccaag 180  
 gctaaacttt ctaattccct tctttgggct cgggggctcc cggagcaggg cgagagctcg 240  
 cgtcgccgga aaggaagacg ggaagaaagg gcaggcggct cggcgggctt cttctccact 300  
 cctctgccgc gtccccgtgg ctgcagggag ccggcatggg gcttctccag ttgctagctt 360  
 tcagtttctt agccctgtgc agagcccgag tgcgcgctca ggaaccgag ttcagctacg 420  
 gctgcgcaga aggcagctgc tatcccgcca cggcgcacct tctcatcggc cgagcacaga 480  
 agctttcggg gacctcgacg tgcgggctgc acaagcccga accctactgt atcgtcagcc 540  
 acttgcagga ggacaaaaaa tgcttcatat gcaattccca agatccttat catgagacc 600  
 tgaatcctga cagccatctc attgaaaatg tggctactac atttgctcca aaccgcctta 660  
 agatttggtg gcaatctgaa aatggtgtgg aaaatgtaac tatccaactg gatttgaag 720  
 cagaattcca ttttactcat ctcataatga ctttcaagac attccgtcca gctgctatgc 780

ES 2 763 433 T3

tgatagaacg atcgtccgac ttgggaaaa cctggggtgt gtatagatac ttgcctatg 840  
 actgtgaggc ctggtttcca ggcatttcaa ctggcccat gaaaaaagtc gatgacataa 900  
 ttgtgattc tcgatattct gacattgaac cctcaactga aggagagggtg atatttcgtg 960  
 ctttagatcc tgctttcaaa atagaagatc cttatagccc aaggatacag aatttattaa 1020  
 aaattaccaa cttgagaatc aagtttgtga aactgcatac ttggggagat aaccttctgg 1080  
 attccaggat ggaaatcaga gaaaagtatt attatgcagt ttatgatatg gtggttcgag 1140  
 gaaattgctt ctgctatggt catgccagcg aatgtgcccc tgtggatgga ttcaatgaag 1200  
 aagtgaagg aatggttcac ggacactgca tgtgcaggca taacaccaag ggcttaaact 1260  
 gtgaactctg catggatttc taccatgatt taccttggag acctgctgaa ggccgaaaca 1320  
 gcaacgcctg taaaaaatgt aactgcaatg aacattccat ctcttgcac ttgacatgg 1380  
 ctgtttacct ggccacgggg aacgtcagcg gaggcgtgtg tgatgactgt cagcacaaca 1440  
 ccatggggcg caactgtgag cagtgcaagc cgttttacta ccagcaccca gagagggaca 1500  
 tccgagatcc taatttcigt gaacgatgta cgtgtgacct agctggctct caaaatgagg 1560  
 gaatttgtga cagctatact gatttttcta ctggtctcat tgctggccag tgcgggtgta 1620  
 aattaaatgt ggaaggagaa cattgtgatg ttgcaaaga aggcttctat gatttaagca 1680  
 gtgaagatcc atttggttgt aaatcttgtg cttgcaatcc tctgggaaca attcctggag 1740  
 ggaatccttg tgattccgag acaggtcact gctactgcaa gcgtctggtg acaggacagc 1800  
 attgtgacca gtgcctgcca gagcactggg gcttaagcaa tgatttggat ggatgtcgac 1860  
 catgtgactg tgaccttggg ggagccttaa acaacagttg ctttgcggag tcaggccagt 1920  
 gctcatgccg gcctcacatg attggacgtc agtgcaacga agtggaaacct ggttactact 1980  
 ttgccaccct ggatcactac ctctatgaag cggaggaagc caacttgggg cctggggtta 2040  
 gcatagtgga goggcaatat atccaggacc ggattccctc ctggactgga gccggcttcg 2100  
 tccagtgcc tgaaggggct tatttggagt tttcattga caacatacca tattccatgg 2160  
 agtacgacat cctaattgc tacgagccac agctaccga ccactgggaa aaagctgtca 2220  
 tcacagtgca gogacctgga aggattcaa ccagcagccg atgtgtaat accatccccg 2280  
 atgatgaaa ccaggtggtg tcattatcac caggctcaag atatgtcgtc ctctctcggc 2340  
 cgggtgtgctt tgagaaggga acaactaca cggtaggtt ggagctgcct cagtacacct 2400  
 cctctgatag cgacgtggag agcccctaca cgctgatcga ttctcttgtt ctcatgcat 2460  
 actgtaaate actggacatc ttcacctgg gaggttcagg agatggggtg gtcaccaaca 2520

ES 2 763 433 T3

gtgcctggga aacctttcag agataccgat gtctagagaa cagcagaagc gttgtgaaaa 2580  
 caccgatgac agatgtttgc agaaacatca tcttttagcat ttctgccctg ttacaccaga 2640  
 caggcctggc ttgtgaatgc gaccctcagg gttcgttaag ttccgtgtgt gatcccaacg 2700  
 gaggccagtg ccagtgccgg cccaacgtgg ttggaagaac ctgcaacaga tgtgcacctg 2760  
 gaacttttgg ctttggcccc agtggatgca aaccttgtga gtgccatctg caaggatctg 2820  
 tcaatgcctt ctgcaatccc gtcactggcc agtgccactg tttccaggga gtgtatgctc 2880  
 ggcagtgtga tcggtgctta cctgggcact ggggctttcc aagttgccag ccctgccagt 2940  
 gcaatggcca cgccgatgac tgcgaccag tgactgggga gtgcttgaac tgccaggact 3000  
 acaccatggg tcataactgt gaaagggtct tggctggta ctatggcgac cccatcattg 3060  
 ggtcaggaga tcaactgcgc ccttgccctt gccagatgg tcccagacagt ggacgccagt 3120  
 ttgccaggag ctgctaccaa gatcctgtta ctttacagct tgctgtgtt tgtgatcctg 3180  
 gatacattgg ttccagatgt gacgactgtg cctcaggata ctttggcaat ccatcagaag 3240  
 ttggggggtc gtgtcagcct tgccagtgtc acaacaacat tgacacgaca gaccagaag 3300  
 cctgtgacaa ggagactggg aggtgtctca agtgcctgta ccacacggaa ggggaacact 3360  
 gtcagttctg ccggtttgga tactatggtg atgccctcca gcaggactgt cgaaagtgtg 3420  
 tctgtaatta cctgggcacc gtgcaagagc actgtaacgg ctctgactgc cagtgcgaca 3480  
 aagccactgg tcagtgttg tgtcttcta atgtgatcg gcagaactgt gaccgctgtg 3540  
 cgccaatac ctggcagctg gccagtggca ctggctgtga cccatgcaac tgcaatgctg 3600  
 ctatttctt cgggccatct tgcaatgagt tcacggggca gtgccagtgc atgcctgggt 3660  
 ttggaggcgg cacctgcagc gagtgccagg aactcttotg gggagacccc gacgtggagt 3720  
 gccgagcctg tgactgtgac cccaggggca ttgagacgcc acagtgtgac cagtccacgg 3780  
 gccagtgtgt ctgogttgag ggtgttgagg gtccacgctg tgacaagtgc acgcgagggt 3840  
 actogggggt cttccctgac tgcacacct gccaccagt ctttgctctc tgggatgtga 3900  
 tcattgccga gctgaccaac aggacacaca gattcctgga gaaagccaag gccttgaaga 3960  
 tcagtgtgt gatcgggcct tacctgaga ctgtggactc ggtggagagg aaagtcagcg 4020  
 agataaaaga catcctggcg cagagccccg cagcagagcc actgaaaaac attgggaatc 4080  
 tctttgagga agcagagaaa ctgattaaag atgttacaga aatgatggct caagtagaag 4140  
 tgaattatc tgacacaact tccaaagca acagcacagc caaagaactg gattctctac 4200  
 agacagaagc cgaaagccta gacaacactg tgaagaact tgctgaacaa ctggaattta 4260  
 tcaaaaactc agatattcgg ggtgccttgg atagcattac caagtattc cagatgtctc 4320

ES 2 763 433 T3

ttgaggcaga ggagagggtg aatgcctcca ccacagaacc caacagcact gtggagcagt 4380  
 cagccctcat gagagacaga gtagaagacg tgatgatgga gcgagaatcc cagttcaagg 4440  
 aaaaaaaga ggagcaggct cgcctccttg atgaactggc aggcaagcta caaagcctag 4500  
 acctttcagc cgctgccgaa atgacctgtg gaacaccccc aggggcctcc tgttccgaga 4560  
 ctgaatgtgg cgggccaaac tgcagaactg acgaaggaga gaggaagtgt gggggcctg 4620  
 gctgtggtgg tctggttact gttgcacaca acgcctggca gaaagccatg gacttgacc 4680  
 aagatgtcct gagtgcctg gctgaagtgg aacagctctc caagatggtc tctgaagcaa 4740  
 aactgagggc agatgaggca aaacaaagtg ctgaagacat tctgttgaag acaaatgcta 4800  
 ccaaagaaaa aatggacaag agcaatgagg agctgagaaa tctaataag caaatcagaa 4860  
 actttttgac ccaggatagt gctgatttg acagcattga agcagttgct aatgaagtat 4920  
 tgaaaatgga gatgcctagc accccacagc agttacagaa cttgacagaa gatatacgtg 4980  
 aacgagtiga aagcctttct caagtagagg ttattcttca gcatagtgtc gctgacattg 5040  
 ccagagctga gatgttgta gaagaagcta aaagagcaag caaaagtga acagatgta 5100  
 aagtcactgc agatatgta aaggaagctc tggaagaagc agaaaaggcc caggtcgcag 5160  
 cagagaaggc aattaaaca gcagatgaag acattcaagg aaccagaac ctgttaactt 5220  
 cgattgagtc tgaaacagca gcttctgagg aaaccttgtt caacgcgtcc cagcgcacatca 5280  
 gcgagttaga gaggaatgtg gaagaactta agcggaaagc tgcccaaac tccggggagg 5340  
 cagaatatat tgaaaaagta gtatatactg tgaagcaaag tgcagaagat gtaagaaga 5400  
 ctttagatgg tgaacttgat gaaaagtata aaaaagtaga aaatttaatt gccaaaaaaa 5460  
 ctgaagagtc agctgatgcc agaaggaaag ccgaaatgct acaaaatgaa gcaaaaactc 5520  
 ttttagctca agcaaatagc aagctgcaac tgctcaaaga tttagaaaga aaatatgaag 5580  
 acaatcaaag atacttagaa gataaagctc aagaattagc aagactggaa ggagaagtcc 5640  
 gttcactoct aaaggatata agocagaaag ttgctgtgta tagcacatgc ttgtaacaga 5700  
 ggagaataaa aatggctga ggtgaacaag gtaaaacaac tacattttaa aactgactt 5760  
 aatgctottc aaaataaac atcacctatt taatgttttt aatcacattt tgtatggagt 5820  
 taataaagt acagtgcctt tgtataaaaa aaaaaaaaa aaaaaa 5866

<210> 4  
 <211> 1786  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 763 433 T3

<400> 4

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

Ala Arg Val Arg Ala Gln Glu Pro Glu Phe Ser Tyr Gly Cys Ala Glu  
 20 25 30

Gly Ser Cys Tyr Pro Ala Thr Gly Asp Leu Leu Ile Gly Arg Ala Gln  
 35 40 45

Lys Leu Ser Val Thr Ser Thr Cys Gly Leu His Lys Pro Glu Pro Tyr  
 50 55 60

Cys Ile Val Ser His Leu Gln Glu Asp Lys Lys Cys Phe Ile Cys Asn  
 65 70 75 80

Ser Gln Asp Pro Tyr His Glu Thr Leu Asn Pro Asp Ser His Leu Ile  
 85 90 95

Glu Asn Val Val Thr Thr Phe Ala Pro Asn Arg Leu Lys Ile Trp Trp  
 100 105 110

Gln Ser Glu Asn Gly Val Glu Asn Val Thr Ile Gln Leu Asp Leu Glu  
 115 120 125

Ala Glu Phe His Phe Thr His Leu Ile Met Thr Phe Lys Thr Phe Arg  
 130 135 140

Pro Ala Ala Met Leu Ile Glu Arg Ser Ser Asp Phe Gly Lys Thr Trp  
 145 150 155 160

Gly Val Tyr Arg Tyr Phe Ala Tyr Asp Cys Glu Ala Ser Phe Pro Gly  
 165 170 175

Ile Ser Thr Gly Pro Met Lys Lys Val Asp Asp Ile Ile Cys Asp Ser  
 180 185 190

Arg Tyr Ser Asp Ile Glu Pro Ser Thr Glu Gly Glu Val Ile Phe Arg  
 195 200 205

Ala Leu Asp Pro Ala Phe Lys Ile Glu Asp Pro Tyr Ser Pro Arg Ile  
 210 215 220

Gln Asn Leu Leu Lys Ile Thr Asn Leu Arg Ile Lys Phe Val Lys Leu



ES 2 763 433 T3

Thr Ile Pro Gly Gly Asn Pro Cys Asp Ser Glu Thr Gly His Cys Tyr  
465 470 475 480

Cys Lys Arg Leu Val Thr Gly Gln His Cys Asp Gln Cys Leu Pro Glu  
485 490 495

His Trp Gly Leu Ser Asn Asp Leu Asp Gly Cys Arg Pro Cys Asp Cys  
500 505 510

Asp Leu Gly Gly Ala Leu Asn Asn Ser Cys Phe Ala Glu Ser Gly Gln  
515 520 525

Cys Ser Cys Arg Pro His Met Ile Gly Arg Gln Cys Asn Glu Val Glu  
530 535 540

Pro Gly Tyr Tyr Phe Ala Thr Leu Asp His Tyr Leu Tyr Glu Ala Glu  
545 550 555 560

Glu Ala Asn Leu Gly Pro Gly Val Ser Ile Val Glu Arg Gln Tyr Ile  
565 570 575

Gln Asp Arg Ile Pro Ser Trp Thr Gly Ala Gly Phe Val Arg Val Pro  
580 585 590

Glu Gly Ala Tyr Leu Glu Phe Phe Ile Asp Asn Ile Pro Tyr Ser Met  
595 600 605

Glu Tyr Asp Ile Leu Ile Arg Tyr Glu Pro Gln Leu Pro Asp His Trp  
610 615 620

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

Ser Arg Cys Gly Asn Thr Ile Pro Asp Asp Asp Asn Gln Val Val Ser  
645 650 655

Leu Ser Pro Gly Ser Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg Pro Val Cys Phe  
660 665 670

Glu Lys Gly Thr Asn Tyr Thr Val Arg Leu Glu Leu Pro Gln Tyr Thr  
675 680 685

Ser Ser Asp Ser Asp Val Glu Ser Pro Tyr Thr Leu Ile Asp Ser Leu  
690 695 700

ES 2 763 433 T3

Val Leu Met Pro Tyr Cys Lys Ser Leu Asp Ile Phe Thr Val Gly Gly  
705 710 715 720

Ser Gly Asp Gly Val Val Thr Asn Ser Ala Trp Glu Thr Phe Gln Arg  
725 730 735

Tyr Arg Cys Leu Glu Asn Ser Arg Ser Val Val Lys Thr Pro Met Thr  
740 745 750

Asp Val Cys Arg Asn Ile Ile Phe Ser Ile Ser Ala Leu Leu His Gln  
755 760 765

Thr Gly Leu Ala Cys Glu Cys Asp Pro Gln Gly Ser Leu Ser Ser Val  
770 775 780

Cys Asp Pro Asn Gly Gly Gln Cys Gln Cys Arg Pro Asn Val Val Gly  
785 790 795 800

Arg Thr Cys Asn Arg Cys Ala Pro Gly Thr Phe Gly Phe Gly Pro Ser  
805 810 815

Gly Cys Lys Pro Cys Glu Cys His Leu Gln Gly Ser Val Asn Ala Phe  
820 825 830

Cys Asn Pro Val Thr Gly Gln Cys His Cys Phe Gln Gly Val Tyr Ala  
835 840 845

Arg Gln Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly His Trp Gly Phe Pro Ser Cys  
850 855 860

Gln Pro Cys Gln Cys Asn Gly His Ala Asp Asp Cys Asp Pro Val Thr  
865 870 875 880

Gly Glu Cys Leu Asn Cys Gln Asp Tyr Thr Met Gly His Asn Cys Glu  
885 890 895

Arg Cys Leu Ala Gly Tyr Tyr Gly Asp Pro Ile Ile Gly Ser Gly Asp  
900 905 910

His Cys Arg Pro Cys Pro Cys Pro Asp Gly Pro Asp Ser Gly Arg Gln  
915 920 925

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

ES 2 763 433 T3

Val Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Asp Cys Ala Ser  
 945 950 955 960

Gly Tyr Phe Gly Asn Pro Ser Glu Val Gly Gly Ser Cys Gln Pro Cys  
 965 970 975

Gln Cys His Asn Asn Ile Asp Thr Thr Asp Pro Glu Ala Cys Asp Lys  
 980 985 990

Glu Thr Gly Arg Cys Leu Lys Cys Leu Tyr His Thr Glu Gly Glu His  
 995 1000 1005

Cys Gln Phe Cys Arg Phe Gly Tyr Tyr Gly Asp Ala Leu Gln Gln  
 1010 1015 1020

Asp Cys Arg Lys Cys Val Cys Asn Tyr Leu Gly Thr Val Gln Glu  
 1025 1030 1035

His Cys Asn Gly Ser Asp Cys Gln Cys Asp Lys Ala Thr Gly Gln  
 1040 1045 1050

Cys Leu Cys Leu Pro Asn Val Ile Gly Gln Asn Cys Asp Arg Cys  
 1055 1060 1065

Ala Pro Asn Thr Trp Gln Leu Ala Ser Gly Thr Gly Cys Asp Pro  
 1070 1075 1080

Cys Asn Cys Asn Ala Ala His Ser Phe Gly Pro Ser Cys Asn Glu  
 1085 1090 1095

Phe Thr Gly Gln Cys Gln Cys Met Pro Gly Phe Gly Gly Arg Thr  
 1100 1105 1110

Cys Ser Glu Cys Gln Glu Leu Phe Trp Gly Asp Pro Asp Val Glu  
 1115 1120 1125

Cys Arg Ala Cys Asp Cys Asp Pro Arg Gly Ile Glu Thr Pro Gln  
 1130 1135 1140

Cys Asp Gln Ser Thr Gly Gln Cys Val Cys Val Glu Gly Val Glu  
 1145 1150 1155

Gly Pro Arg Cys Asp Lys Cys Thr Arg Gly Tyr Ser Gly Val Phe

ES 2 763 433 T3

1160						1165						1170
Pro Asp	Cys Thr	Pro Cys	His	Gln Cys	Phe Ala	Leu	Trp Asp	Val				
1175			1180			1185						
Ile Ile	Ala Glu	Leu Thr	Asn	Arg Thr	His Arg	Phe	Leu Glu	Lys				
1190			1195			1200						
Ala Lys	Ala Leu	Lys Ile	Ser	Gly Val	Ile Gly	Pro	Tyr Arg	Glu				
1205			1210			1215						
Thr Val	Asp Ser	Val Glu	Arg	Lys Val	Ser Glu	Ile	Lys Asp	Ile				
1220			1225			1230						
Leu Ala	Gln Ser	Pro Ala	Ala	Glu Pro	Leu Lys	Asn	Ile Gly	Asn				
1235			1240			1245						
Leu Phe	Glu Glu	Ala Glu	Lys	Leu Ile	Lys Asp	Val	Thr Glu	Met				
1250			1255			1260						
Met Ala	Gln Val	Glu Val	Lys	Leu Ser	Asp Thr	Thr	Ser Gln	Ser				
1265			1270			1275						
Asn Ser	Thr Ala	Lys Glu	Leu	Asp Ser	Leu Gln	Thr	Glu Ala	Glu				
1280			1285			1290						
Ser Leu	Asp Asn	Thr Val	Lys	Glu Leu	Ala Glu	Gln	Leu Glu	Phe				
1295			1300			1305						
Ile Lys	Asn Ser	Asp Ile	Arg	Gly Ala	Leu Asp	Ser	Ile Thr	Lys				
1310			1315			1320						
Tyr Phe	Gln Met	Ser Leu	Glu	Ala Glu	Glu Arg	Val	Asn Ala	Ser				
1325			1330			1335						
Thr Thr	Glu Pro	Asn Ser	Thr	Val Glu	Gln Ser	Ala	Leu Met	Arg				
1340			1345			1350						
Asp Arg	Val Glu	Asp Val	Met	Met Glu	Arg Glu	Ser	Gln Phe	Lys				
1355			1360			1365						
Glu Lys	Gln Glu	Glu Gln	Ala	Arg Leu	Leu Asp	Glu	Leu Ala	Gly				
1370			1375			1380						

ES 2 763 433 T3

Lys Leu Gln Ser Leu Asp Leu Ser Ala Ala Ala Glu Met Thr Cys  
 1385 1390 1395  
 Gly Thr Pro Pro Gly Ala Ser Cys Ser Glu Thr Glu Cys Gly Gly  
 1400 1405 1410  
 Pro Asn Cys Arg Thr Asp Glu Gly Glu Arg Lys Cys Gly Gly Pro  
 1415 1420 1425  
 Gly Cys Gly Gly Leu Val Thr Val Ala His Asn Ala Trp Gln Lys  
 1430 1435 1440  
 Ala Met Asp Leu Asp Gln Asp Val Leu Ser Ala Leu Ala Glu Val  
 1445 1450 1455  
 Glu Gln Leu Ser Lys Met Val Ser Glu Ala Lys Leu Arg Ala Asp  
 1460 1465 1470  
 Glu Ala Lys Gln Ser Ala Glu Asp Ile Leu Leu Lys Thr Asn Ala  
 1475 1480 1485  
 Thr Lys Glu Lys Met Asp Lys Ser Asn Glu Glu Leu Arg Asn Leu  
 1490 1495 1500  
 Ile Lys Gln Ile Arg Asn Phe Leu Thr Gln Asp Ser Ala Asp Leu  
 1505 1510 1515  
 Asp Ser Ile Glu Ala Val Ala Asn Glu Val Leu Lys Met Glu Met  
 1520 1525 1530  
 Pro Ser Thr Pro Gln Gln Leu Gln Asn Leu Thr Glu Asp Ile Arg  
 1535 1540 1545  
 Glu Arg Val Glu Ser Leu Ser Gln Val Glu Val Ile Leu Gln His  
 1550 1555 1560  
 Ser Ala Ala Asp Ile Ala Arg Ala Glu Met Leu Leu Glu Glu Ala  
 1565 1570 1575  
 Lys Arg Ala Ser Lys Ser Ala Thr Asp Val Lys Val Thr Ala Asp  
 1580 1585 1590  
 Met Val Lys Glu Ala Leu Glu Glu Ala Glu Lys Ala Gln Val Ala  
 1595 1600 1605

ES 2 763 433 T3

Ala Glu Lys Ala Ile Lys Gln Ala Asp Glu Asp Ile Gln Gly Thr  
1610 1615 1620

Gln Asn Leu Leu Thr Ser Ile Glu Ser Glu Thr Ala Ala Ser Glu  
1625 1630 1635

Glu Thr Leu Phe Asn Ala Ser Gln Arg Ile Ser Glu Leu Glu Arg  
1640 1645 1650

Asn Val Glu Glu Leu Lys Arg Lys Ala Ala Gln Asn Ser Gly Glu  
1655 1660 1665

Ala Glu Tyr Ile Glu Lys Val Val Tyr Thr Val Lys Gln Ser Ala  
1670 1675 1680

Glu Asp Val Lys Lys Thr Leu Asp Gly Glu Leu Asp Glu Lys Tyr  
1685 1690 1695

Lys Lys Val Glu Asn Leu Ile Ala Lys Lys Thr Glu Glu Ser Ala  
1700 1705 1710

Asp Ala Arg Arg Lys Ala Glu Met Leu Gln Asn Glu Ala Lys Thr  
1715 1720 1725

Leu Leu Ala Gln Ala Asn Ser Lys Leu Gln Leu Leu Lys Asp Leu  
1730 1735 1740

Glu Arg Lys Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Tyr Leu Glu Asp Lys Ala  
1745 1750 1755

Gln Glu Leu Ala Arg Leu Glu Gly Glu Val Arg Ser Leu Leu Lys  
1760 1765 1770

Asp Ile Ser Gln Lys Val Ala Val Tyr Ser Thr Cys Leu  
1775 1780 1785

<210> 5  
<211> 5817  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

ES 2 763 433 T3

gaaggcagtt tccggagggg aggggtaggg ttgggggtggg ggcgctctcc gcccggtggt 60  
gcgctccttc ccagaatccg ctccggcctt tcttctctgc cgcattccc aactttgctc 120

ES 2 763 433 T3

aaagtcgctg gactctaagc tgtcggaggg accgctggac agacctggga actgacagag 180  
 ggcttgagg gaaacaggcc aaagaccac aggcagagtt gacacggaac cccaaagcaa 240  
 ggaggagggc tggggcccga gaccgttcac ctccccttat ccctgttccc ctcttcagga 300  
 tggagctgac ctcaagggaa agagggaggg gacagcctct gccctgggaa cttcgactgg 360  
 gcctactgct aagcgtgctg gctgccacac tggcacaggc ccctgccccg gatgtgcctg 420  
 gctgttcag gggaagctgc taccocgcca cgggcgacct gctggtgggc cgagctgaca 480  
 gactgactgc ctcatccact tgtggcctga atggcccca gccctactgc atcgtcagtc 540  
 acctgcagga cgaagaag tgcttccttt gtgactcccg gcgcccttc tctgctagag 600  
 acaaccaca cagccatcgc atccagaatg tagtcaccag ctttgacca cagcggcggg 660  
 cagcctggtg gcagtcaag aatggatatc ctgcggtcac catccagctg gacctggagg 720  
 ctgagttca ttccacacac ctattatga ccttcaagac atttcgccct gctgccatgc 780  
 tgggtggaacg ctacagcagc ttggccgca cctggcatgt gtaccgatat ttctctatg 840  
 actgtggggc tgacttcca ggagtccac tagcaccccc acggcactgg gatgatgtag 900  
 tctgtgagtc ccgctactca gagattgagc catccactga aggcgaggtc atctatcgtg 960  
 tgctggacc tgccatccct atcccagacc cctacagctc acggattcag aacctgttga 1020  
 agatcaccaa cctacgggtg aacctgactc gtctacacac gttgggagac aacctactcg 1080  
 acccacggag ggagatccga gagaagtact actatgccct ctatgagctg gttgtacgtg 1140  
 gaaactgctt ctgctacgga cagcctcag agtgtgcacc cggcccaggg gcaccagccc 1200  
 atgctgagg catggtgcac ggagcttga tctgcaaaca caacacacgt gccctcaact 1260  
 gcgagcagtg tcaggatttc tatcgtgacc tgccctggcg tccggctgag gacggccata 1320  
 gtcctgctg taggaagtgt gactgcatg ggcacacca cagctgccac ttcgacatgg 1380  
 ccgtatacct ggcatctggc aatgtgagtg gaggtgtgtg tgatggatgt cagcataaca 1440  
 cagctggggc cactgtgag ctctgtcggc ccttcttcta ccgtgacca accaaggacc 1500  
 tgcgggatcc ggtgtgtgc cgtcctgtg attgtgacct catgggttct caagacggtg 1560  
 gtogctgta ttccatgat gacctgcac tgggactggt ctccggccag tctogctgca 1620  
 aagaacatgt gttgggcaact cgtgccagc aatgccgtga tggcttctt gggtcagca 1680  
 tcagtaccg tctgggctgc cggcagatgc aatgtaatgc acggggcaca gtgctggga 1740  
 gcactcctg tgacccaac agtggatcct gttactgaa acgtctagtg actggacgtg 1800  
 gatgtaccg ctgctgcct gccactggg gcctgagcca cgacctgctc ggctgccgcc 1860  
 cctgtgactg cgacgtgggt ggtgcttgg atccccagt tgatgagggc acaggtcaat 1920

ES 2 763 433 T3

gccactgccg ccagcacatg gttgggcgac gctgtgagca ggtgcaacct ggctacttcc 1980  
 ggccottcct ggaccaccta atttgggagg ctgaggacac ccgagggcag gtgctogatg 2040  
 tggtggagcg cctggtgacc cccggggaaa ctccatcctg gactggctca ggcttogtgc 2100  
 ggctacagga aggtcagacc ctggagttcc tggtggcctc tgtgccgaag gctatggact 2160  
 atgacctgct gctgcgctta gagccccagg tccctgagca atgggcagag ttggaactga 2220  
 ttgtgcagcg tccagggcct gtgcctgccc acagcctgtg tgggcatttg gtgcccgaag 2280  
 atgatogcat ccaagggact ctgcaaccac atgccaggta cttgatattt cctaatacctg 2340  
 tctgccttga gcctggtatc tcctacaagc tgcatctgaa gctggtacgg acagggggaa 2400  
 gtgcccagcc tgagactccc tactctggac ctggcctgct cattgactcg ctggigtgc 2460  
 tgccccgtgt cctggtgcta gagatgttta gtgggggtga tgctgctgcc ctggagcgcc 2520  
 aggccacctt tgaacgtac caatgccatg aggagggctt ggtgccagc aagacttctc 2580  
 cctctgaggc ctggcacccc ctccatca gctgtccac cctcatctac aatggtgccc 2640  
 tgccatgtca gtgcaaccct caaggttcac tgagttctga gtgcaaccct catggtggtc 2700  
 agtgcctgtg caagcctgga gtggttgggc gccgctgtga cctctgtgcc cctggctact 2760  
 atggctttgg ccccacaggc tgcaagcct gccagtgcag ccacgagggg gcactcagca 2820  
 gtctctgtga aaagaccagt gggcaatgtc tctgtogaac tggcctttt gggcttcgct 2880  
 gtgaccgctg ccagcgtggc cagtgggat tccctagctg ccggccatgt gtctgcaatg 2940  
 ggcatgcaga tgagtgaac acccacacag gcgcttgctt gggctgccgt gatcacacag 3000  
 ggggtgagca ctgtgaaagg tgcattgctg gtttccacgg ggaccacgg ctgccatag 3060  
 ggggccagtg ccggccctgt ccctgtcctg aaggccctgg gagccaacgg cactttgcta 3120  
 cttcttgcca ccaggatgaa tattcccagc agattgtgtg ccaactgccg gcaggctata 3180  
 cgggctgctg atgtgaagct tgtcccctg ggcactttgg ggacctatca aggccaggtg 3240  
 gccggtgcca actgtgtgag tgcaagtggga acattgacct aatggatcct gatgcctgtg 3300  
 acccccacac ggggcaatgc ctgcgctgtt tacaccacac agaggtcca cactgtgccc 3360  
 actgcaagcc tggcttccat gggcaggctg cccgacagag ctgtcaccgc tgcacatgca 3420  
 acctgctggg cacaaatccg cagcagtgcc catctcctga ccagtgccac tgtgatcaa 3480  
 gcagtgggca gtgcccagtc ctcccgaatg tccagggccc tagctgtgac cgctgtgccc 3540  
 ccaacttctg gaacctcacc agtggccatg gttgccagcc ttgtgcctgc cacccaagcc 3600  
 gggccagagg ccccacctgc aacgagttca cagggcagtg ccactgccgt gccggctttg 3660

ES 2 763 433 T3

gagggcggac ttgttctgag tgccaagagc tccactgggg agaccctggg ttgcagtgcc 3720  
atgcctgtga ttgtgactct cgtggaatag atacacctca gtgtcaccgc ttcacagtc 3780  
actgcagctg ccgccaggg gtgtctgggt tgcgctgtga ccagtgtgcc cgtggcttct 3840  
caggaatctt tctgcctgc catccctgcc atgcatgctt cggggattgg gaccgagtgg 3900  
tgcaggactt ggcagcccggt acacagcgc tagagcagcg ggcgaggag ttgcaacaga 3960  
cgggtgtgct ggggtgccttt gagagcagct tctggcacat gcaggagaag ctgggcattg 4020  
tgcagggcat cgtaggtgcc cgcaacacct cagccgcctc cactgcacag cttgtggagg 4080  
ccacagagga gctgcggcgt gaaattgggg aggccactga gcacctgact cagctcgagg 4140  
cagacctgac agatgtgcaa gatgagaact tcaatgcaa ccatgcacta agtggcttgg 4200  
agcgagatag gcttgcaactt aatctcacac tgcggcagct cgaccagcat cttgacttgc 4260  
tcaaacattc aaacttcctg ggtgcctatg acagcatccg gcatgcccac agccagtctg 4320  
cagaggcaga acgtcgtgcc aatacctcag ccctggcagt acctagccct gtgagcaact 4380  
cggcaagtgc toggcatcgg acagaggcac tgatggatgc tcagaaggag gacttcaaca 4440  
gcaaacacat ggccaaccag cgggcacttg gcaagctctc tgccatacc cacaccctga 4500  
gcctgacaga cataaatgag ctgggtgtgt gggcaccagg ggatgcacc tgtgtctaaa 4560  
gcccttgtgg gggtgccggc tgtcgagatg aggatgggca gccgcgctgt gggggcctca 4620  
gtgcaatgg ggcagcggct acagcagacc tagcactggg ccgggcccgg cacacacagg 4680  
cagagctgca cggggcactg gcagaagggt gtagcatcct cagcagagtg gctgagactc 4740  
gtcggcaggc aagcgaggca cagcagcggg ccagggcagc cctggacaag gctaattgctt 4800  
ccaggggaca ggtggaacag gcccaaccagg aacttcaaga acttatccag agtgtgaagg 4860  
acttctcaa ccaggagggg gctgatcctg atagcattga aatgggtggc acacgggtgc 4920  
tagagctctc catcccagct tcagctgagc agatccagca cctggcgggt gcgattgcag 4980  
agcgagtccg gagcctggca gatgtggatg cgatcctggc acgtactgta ggagatgtgc 5040  
gtcgtgccga gcagctactg caggatgcac ggcgggcaag gagctgggct gaggatgaga 5100  
aacagaaggc agagacagta caggcagcac tggaggaggc ccagcgggca cagggtattg 5160  
cccaggggtc catccggggg gcagtggctg acacacggga cacagagcag acctgtacc 5220  
aggtacagga gaggatggca ggtgcagagc gggcactgag ctctgcagg gaaagggctc 5280  
ggcagttgga tgctctcctg gaggctctga aattgaaacg ggcaggaaat agtctggcag 5340  
cctctacagc agaagaaaac gcaggcagtg ccagggctg tgcccaggag gctgagcagc 5400  
tgctacgcgg tcctctgggt gatcagtacc agacgggtgaa ggccttagct gagcgaagg 5460

ES 2 763 433 T3

cccaaggtgt gctggctgca caggcaaggg cagaacaact gcgggatgag gctcgggacc 5520  
 tgttgcaagc cgctcaggac aagctgcagc ggctacagga attggaaggc acctatgagg 5580  
 aaaatgagcg ggcactggag agtaaggcag ccagttgga cgggttgag gccaggatgc 5640  
 gcagcgtgct tcaagccatc aacttgcagg tgcagatcta caacacctgc cagtgacccc 5700  
 tgcccaaggc ctaccccagt tcctagcact gcccacatg catgtctgcc tatgcaactga 5760  
 agagctottg gcccggcagg gcccacaata aaccagtgtg aacccccaaa aaaaaaa 5817

<210> 6  
 <211> 1798  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

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

ES 2 763 433 T3

Leu Val Glu Arg Ser Ala Asp Phe Gly Arg Thr Trp His Val Tyr Arg  
 165 170 175

Tyr Phe Ser Tyr Asp Cys Gly Ala Asp Phe Pro Gly Val Pro Leu Ala  
 180 185 190

Pro Pro Arg His Trp Asp Asp Val Val Cys Glu Ser Arg Tyr Ser Glu  
 195 200 205

Ile Glu Pro Ser Thr Glu Gly Glu Val Ile Tyr Arg Val Leu Asp Pro  
 210 215 220

Ala Ile Pro Ile Pro Asp Pro Tyr Ser Ser Arg Ile Gln Asn Leu Leu  
 225 230 235 240

Lys Ile Thr Asn Leu Arg Val Asn Leu Thr Arg Leu His Thr Leu Gly  
 245 250 255

Asp Asn Leu Leu Asp Pro Arg Arg Glu Ile Arg Glu Lys Tyr Tyr Tyr  
 260 265 270

Ala Leu Tyr Glu Leu Val Val Arg Gly Asn Cys Phe Cys Tyr Gly His  
 275 280 285

Ala Ser Glu Cys Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro Ala His Ala Glu Gly  
 290 295 300

Met Val His Gly Ala Cys Ile Cys Lys His Asn Thr Arg Gly Leu Asn  
 305 310 315 320

Cys Glu Gln Cys Gln Asp Phe Tyr Arg Asp Leu Pro Trp Arg Pro Ala  
 325 330 335

Glu Asp Gly His Ser His Ala Cys Arg Lys Cys Glu Cys His Gly His  
 340 345 350

Thr His Ser Cys His Phe Asp Met Ala Val Tyr Leu Ala Ser Gly Asn  
 355 360 365

Val Ser Gly Gly Val Cys Asp Gly Cys Gln His Asn Thr Ala Gly Arg  
 370 375 380

His Cys Glu Leu Cys Arg Pro Phe Phe Tyr Arg Asp Pro Thr Lys Asp



ES 2 763 433 T3

Leu Arg Leu Glu Pro Gln Val Pro Glu Gln Trp Ala Glu Leu Glu Leu  
625 630 635 640

Ile Val Gln Arg Pro Gly Pro Val Pro Ala His Ser Leu Cys Gly His  
645 650 655

Leu Val Pro Lys Asp Asp Arg Ile Gln Gly Thr Leu Gln Pro His Ala  
660 665 670

Arg Tyr Leu Ile Phe Pro Asn Pro Val Cys Leu Glu Pro Gly Ile Ser  
675 680 685

Tyr Lys Leu His Leu Lys Leu Val Arg Thr Gly Gly Ser Ala Gln Pro  
690 695 700

Glu Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Gly Leu Leu Ile Asp Ser Leu Val Leu  
705 710 715 720

Leu Pro Arg Val Leu Val Leu Glu Met Phe Ser Gly Gly Asp Ala Ala  
725 730 735

Ala Leu Glu Arg Gln Ala Thr Phe Glu Arg Tyr Gln Cys His Glu Glu  
740 745 750

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

Leu Ile Ser Leu Ser Thr Leu Ile Tyr Asn Gly Ala Leu Pro Cys Gln  
770 775 780

Cys Asn Pro Gln Gly Ser Leu Ser Ser Glu Cys Asn Pro His Gly Gly  
785 790 795 800

Gln Cys Leu Cys Lys Pro Gly Val Val Gly Arg Arg Cys Asp Leu Cys  
805 810 815

Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Phe Gly Pro Thr Gly Cys Gln Ala Cys Gln  
820 825 830

Cys Ser His Glu Gly Ala Leu Ser Ser Leu Cys Glu Lys Thr Ser Gly  
835 840 845

Gln Cys Leu Cys Arg Thr Gly Ala Phe Gly Leu Arg Cys Asp Arg Cys  
850 855 860

ES 2 763 433 T3

Gln Arg Gly Gln Trp Gly Phe Pro Ser Cys Arg Pro Cys Val Cys Asn  
 865 870 875 880

Gly His Ala Asp Glu Cys Asn Thr His Thr Gly Ala Cys Leu Gly Cys  
 885 890 895

Arg Asp His Thr Gly Gly Glu His Cys Glu Arg Cys Ile Ala Gly Phe  
 900 905 910

His Gly Asp Pro Arg Leu Pro Tyr Gly Gly Gln Cys Arg Pro Cys Pro  
 915 920 925

Cys Pro Glu Gly Pro Gly Ser Gln Arg His Phe Ala Thr Ser Cys His  
 930 935 940

Gln Asp Glu Tyr Ser Gln Gln Ile Val Cys His Cys Arg Ala Gly Tyr  
 945 950 955 960

Thr Gly Leu Arg Cys Glu Ala Cys Ala Pro Gly His Phe Gly Asp Pro  
 965 970 975

Ser Arg Pro Gly Gly Arg Cys Gln Leu Cys Glu Cys Ser Gly Asn Ile  
 980 985 990

Asp Pro Met Asp Pro Asp Ala Cys Asp Pro His Thr Gly Gln Cys Leu  
 995 1000 1005

Arg Cys Leu His His Thr Glu Gly Pro His Cys Ala His Cys Lys  
 1010 1015 1020

Pro Gly Phe His Gly Gln Ala Ala Arg Gln Ser Cys His Arg Cys  
 1025 1030 1035

Thr Cys Asn Leu Leu Gly Thr Asn Pro Gln Gln Cys Pro Ser Pro  
 1040 1045 1050

Asp Gln Cys His Cys Asp Pro Ser Ser Gly Gln Cys Pro Cys Leu  
 1055 1060 1065

Pro Asn Val Gln Gly Pro Ser Cys Asp Arg Cys Ala Pro Asn Phe  
 1070 1075 1080

Trp Asn Leu Thr Ser Gly His Gly Cys Gln Pro Cys Ala Cys His  
 1085 1090 1095

ES 2 763 433 T3

Pro Ser Arg Ala Arg Gly Pro Thr Cys Asn Glu Phe Thr Gly Gln  
 1100 1105 1110

Cys His Cys Arg Ala Gly Phe Gly Gly Arg Thr Cys Ser Glu Cys  
 1115 1120 1125

Gln Glu Leu His Trp Gly Asp Pro Gly Leu Gln Cys His Ala Cys  
 1130 1135 1140

Asp Cys Asp Ser Arg Gly Ile Asp Thr Pro Gln Cys His Arg Phe  
 1145 1150 1155

Thr Gly His Cys Ser Cys Arg Pro Gly Val Ser Gly Val Arg Cys  
 1160 1165 1170

Asp Gln Cys Ala Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Pro Ala Cys His  
 1175 1180 1185

Pro Cys His Ala Cys Phe Gly Asp Trp Asp Arg Val Val Gln Asp  
 1190 1195 1200

Leu Ala Ala Arg Thr Gln Arg Leu Glu Gln Arg Ala Gln Glu Leu  
 1205 1210 1215

Gln Gln Thr Gly Val Leu Gly Ala Phe Glu Ser Ser Phe Trp His  
 1220 1225 1230

Met Gln Glu Lys Leu Gly Ile Val Gln Gly Ile Val Gly Ala Arg  
 1235 1240 1245

Asn Thr Ser Ala Ala Ser Thr Ala Gln Leu Val Glu Ala Thr Glu  
 1250 1255 1260

Glu Leu Arg Arg Glu Ile Gly Glu Ala Thr Glu His Leu Thr Gln  
 1265 1270 1275

Leu Glu Ala Asp Leu Thr Asp Val Gln Asp Glu Asn Phe Asn Ala  
 1280 1285 1290

Asn His Ala Leu Ser Gly Leu Glu Arg Asp Arg Leu Ala Leu Asn  
 1295 1300 1305

Leu Thr Leu Arg Gln Leu Asp Gln His Leu Asp Leu Leu Lys His

ES 2 763 433 T3

1310		1315		1320										
Ser	Asn	Phe	Leu	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ser	Ile	Arg	His	Ala	His	Ser
	1325					1330					1335			
Gln	Ser	Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Arg	Ala	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala
	1340					1345					1350			
Val	Pro	Ser	Pro	Val	Ser	Asn	Ser	Ala	Ser	Ala	Arg	His	Arg	Thr
	1355					1360					1365			
Glu	Ala	Leu	Met	Asp	Ala	Gln	Lys	Glu	Asp	Phe	Asn	Ser	Lys	His
	1370					1375					1380			
Met	Ala	Asn	Gln	Arg	Ala	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Ala	His	Thr	His
	1385					1390					1395			
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Asp	Ile	Asn	Glu	Leu	Val	Cys	Gly	Ala	Pro
	1400					1405					1410			
Gly	Asp	Ala	Pro	Cys	Ala	Thr	Ser	Pro	Cys	Gly	Gly	Ala	Gly	Cys
	1415					1420					1425			
Arg	Asp	Glu	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Cys	Gly	Gly	Leu	Ser	Cys	Asn
	1430					1435					1440			
Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Asp	Leu	Ala	Leu	Gly	Arg	Ala	Arg	His
	1445					1450					1455			
Thr	Gln	Ala	Glu	Leu	Gln	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Gly	Ser	Ile
	1460					1465					1470			
Leu	Ser	Arg	Val	Ala	Glu	Thr	Arg	Arg	Gln	Ala	Ser	Glu	Ala	Gln
	1475					1480					1485			
Gln	Arg	Ala	Gln	Ala	Ala	Leu	Asp	Lys	Ala	Asn	Ala	Ser	Arg	Gly
	1490					1495					1500			
Gln	Val	Glu	Gln	Ala	Asn	Gln	Glu	Leu	Gln	Glu	Leu	Ile	Gln	Ser
	1505					1510					1515			
Val	Lys	Asp	Phe	Leu	Asn	Gln	Glu	Gly	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Ile
	1520					1525					1530			

ES 2 763 433 T3

Glu Met Val Ala Thr Arg Val Leu Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ser  
 1535 1540 1545  
 Ala Glu Gln Ile Gln His Leu Ala Gly Ala Ile Ala Glu Arg Val  
 1550 1555 1560  
 Arg Ser Leu Ala Asp Val Asp Ala Ile Leu Ala Arg Thr Val Gly  
 1565 1570 1575  
 Asp Val Arg Arg Ala Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala Arg Arg Ala  
 1580 1585 1590  
 Arg Ser Trp Ala Glu Asp Glu Lys Gln Lys Ala Glu Thr Val Gln  
 1595 1600 1605  
 Ala Ala Leu Glu Glu Ala Gln Arg Ala Gln Gly Ile Ala Gln Gly  
 1610 1615 1620  
 Ala Ile Arg Gly Ala Val Ala Asp Thr Arg Asp Thr Glu Gln Thr  
 1625 1630 1635  
 Leu Tyr Gln Val Gln Glu Arg Met Ala Gly Ala Glu Arg Ala Leu  
 1640 1645 1650  
 Ser Ser Ala Gly Glu Arg Ala Arg Gln Leu Asp Ala Leu Leu Glu  
 1655 1660 1665  
 Ala Leu Lys Leu Lys Arg Ala Gly Asn Ser Leu Ala Ala Ser Thr  
 1670 1675 1680  
 Ala Glu Glu Thr Ala Gly Ser Ala Gln Gly Arg Ala Gln Glu Ala  
 1685 1690 1695  
 Glu Gln Leu Leu Arg Gly Pro Leu Gly Asp Gln Tyr Gln Thr Val  
 1700 1705 1710  
 Lys Ala Leu Ala Glu Arg Lys Ala Gln Gly Val Leu Ala Ala Gln  
 1715 1720 1725  
 Ala Arg Ala Glu Gln Leu Arg Asp Glu Ala Arg Asp Leu Leu Gln  
 1730 1735 1740  
 Ala Ala Gln Asp Lys Leu Gln Arg Leu Gln Glu Leu Glu Gly Thr  
 1745 1750 1755

ES 2 763 433 T3

Tyr Glu Glu Asn Glu Arg Ala Leu Glu Ser Lys Ala Ala Gln Leu  
1760 1765 1770

Asp Gly Leu Glu Ala Arg Met Arg Ser Val Leu Gln Ala Ile Asn  
1775 1780 1785

Leu Gln Val Gln Ile Tyr Asn Thr Cys Gln  
1790 1795

<210> 7

<211> 7889

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

ES 2 763 433 T3

gtgcaggctg ctccccgggt aggtgaggga agcgcggagg cggcgcgcgg gggcagtggt 60  
 cggcgagcag cgcggtcctc gctaggggoc cccacccgtc agtctctccg gcgcgagccg 120  
 ccgccaccgc ccgcgccgga gtcaggcccc tgggccccca ggctcaagca gcgaagcggc 180  
 ctccggggga cgcgcctagg cgagaggaac gcgccggtgc ccttgccctc gccgtgacct 240  
 agcgtgcggg cggcgggatg agagggagcc atcgggcccgc gccggccctg cggccccggg 300  
 ggcggctctg gcccgctctg gccgtgctgg cggcggcccgc cgcggcgggc tgtgcccagg 360  
 cagccatgga cgagtgcacg gacgagggcg ggcggccgca gcgctgcatg cccgagttcg 420  
 tcaacccgc cttcaacgtg actgtggtgg ccaccaacac gtgtgggact ccgcccaggg 480  
 aatactgtgt gcagaccggg gtgaccgggg tcaccaagtc ctgtcacctg tgcgacgccg 540  
 ggcagcccca cctgcagcac ggggcagcct tcctgaccga ctacaacaac caggccgaca 600  
 ccacctggtg gcaaagccag accatgctgg ccggggtgca gtaccccagc tccatcaacc 660  
 tcacgctgca cctgggaaaa gcttttgaca tcacctatgt gcgtctcaag ttccacacca 720  
 gccgcccgga gagctttgcc atttacaagc gcacacggga agacgggccc tggattcctt 780  
 accagtacta cagtggttcc tgtgagaaca cctactccaa ggcaaaccgc ggcttcatca 840  
 ggacaggagg ggacgagcag caggccttgt gtactgatga attcagtgac atttctcccc 900  
 tcaactggggg caacgtggcc ttttctaccc tgggaaggaag gccagcgcc tataactttg 960  
 acaatagccc tgtgctgcag gaatgggtaa ctgccactga catcagagta actcttaato 1020  
 gcctgaacac ttttggagat gaagtgttta acgatcccaa agttctcaag tcctattatt 1080  
 atgccatctc tgatthtctg gtaggtggca gatgtaaag taatggacac gcaagcgagt 1140  
 gtatgaagaa cgaatttgat aagctggtgt gtaattgcaa acataacaca tatggagtag 1200

ES 2 763 433 T3

actgtgaaaa gtgtcttctt ttcttcaatg accggcogtg gaggagggca actgcgaaaa 1260  
 gtgccagtga atgcctgccc tgtgattgca atggctgata ccaggaatgc tacttcgacc 1320  
 ctgaactcta tcgttccact ggccatgggg gccactgtac caactgccag gataacacag 1380  
 atggcgccca ctgtgagagg tgccgagaga acttcttccg ccttggcaac aatgaagcct 1440  
 gctcttcatg ccactgtagt cctgtgggct ctctaagcac acagtgtgat agttacggca 1500  
 gatgcagctg taagccagga gtgatggggg acaaatgtga cgttggcag cctggattcc 1560  
 attctctcac tgaagcagga tgcaggccat gctcttgtga tccctctggc agcatagatg 1620  
 aatgtaatat tgaacagga agatgtgttt gcaaagacaa tgtcgaaggc ttcaattgtg 1680  
 aaagatgcaa acctggattt tttaatctgg aatcatctaa tcctcggggt tgcacaccct 1740  
 gcttctgctt tgggcattct tctgtctgta caaacgctgt tggctacagt gtttattcta 1800  
 tctcctctac ctttcagatt gatgaggatg ggtggcgtgc ggaacagaga gatggctctg 1860  
 aagcatctct cgagtgggcc tctgagagga aagatatcgc cgtgatctca gacagctact 1920  
 ttctctgcta cttcattgct cctgcaaagt tcttgggcaa gcagggtgtg agttatggtc 1980  
 agaacctctc cttctccttt cgagtggaca ggcgagatac tcgcctctct gcagaagacc 2040  
 ttgtgcttga gggagctggc ttaagagtat ctgtaccctt gatcgcctcag ggcaattcct 2100  
 atccaagtga gaccactgtg aagtatgtct tcaggctcca tgaagcaaca gattaccctt 2160  
 ggaggcctgc tottaccctt ttgaatttc agaagctcct aaacaacttg acctctatca 2220  
 agatacgtgg gacatacagt gagagaagtg ctggatattt ggatgatgtc acctggcaa 2280  
 gtgctcgtcc tgggcctgga gtccctgcaa cttgggtgga gtctcgcacc tgcctgtgg 2340  
 gatatggagg gcagttttgt gagatgtgoc totcaggtta cagaagagaa actoctaatc 2400  
 ttggaccata cagtccatgt gtgctttgcg cctgcaatgg acacagcgag acctgtgatc 2460  
 ctgagacagg tgtttgtaac tgcagagaca ataccggctgg ccgcactgt gagaagtgca 2520  
 gtgatgggta ctatggagat tcaactgcag gcacctctc cgattgcca cctgttccgt 2580  
 gtcctggagg ttcaagtgt gctgttgttc ccaagacaaa ggagggtgtg tgcaccaact 2640  
 gtcctactgg caccactggt aagagatgtg agctctgtga tgatggctac ttggagacc 2700  
 ccctgggtag aaacggccct gtgagacttt gccgcctgtg ccagtgcagt gacaacatcg 2760  
 atcccaatgc agttggaat tgoaatcgt tgacgggaga atgcctgaag tgcactata 2820  
 aactgtctgg cttctattgt gaccggtgca aagacggatt ttttggaaat ccctgtgctc 2880  
 ccaatccagc agacaaatgc aaagcctgca attgcaatct gtatgggacc atgaagcagc 2940  
 agagcagctg taaccccgtg acggggcagt gtgaatgttt gcctcacgtg actggccagg 3000

ES 2 763 433 T3

actgtggtgc ttgtgacct ggattctaca atctgcagag tgggcaaggc tgtgagaggt 3060  
 gtgactgcc a tgccttgggc tccaccaatg ggcagtgtga catccgcacc ggccagtgtg 3120  
 agtgccagcc cggcatcact ggtcagcact gtgagcgtg tgaggtcaac cactttgggt 3180  
 ttggacctga aggctgcaaa ccctgtgact gtcacctga gggatctctt tcacttcagt 3240  
 gcaaagatga tggtcgctgt gaatgcagag aaggctttgt gggaaatcgc tgtgaccagt 3300  
 gtgaagaaaa ctatttctac aatcggctct ggctggctg ccaggaatgt ccagcttgtt 3360  
 accggctggt aaagataag gttgctgac atagagtga gctccaggaa ttagagagtc 3420  
 tcatagcaaa ccttgaact ggggatgaga tggtgacaga tcaagcctt caggatagac 3480  
 taaaggaagc agagaggaa gttatggacc tccttcgtga ggccaggat gtcaaagatg 3540  
 ttgaccagaa tttgatgat cgcctacaga gagtgaataa cactctgtcc agccaaatta 3600  
 gccgtttaca gaatatccgg aataccattg aagagactgg aaacttggct gaacaagcgc 3660  
 gtgccatgt agagaacaca gagcggttga ttgaaatcgc atccagagaa cttgagaaag 3720  
 caaaagtcgc tgctccaat gtgtcagtca ctcagccaga atctacagg gacccaaaca 3780  
 acatgactct tttggcagaa gaggctcga agcttctga acgtcataaa caggaagctg 3840  
 atgacattgt tcgagtggca aagacagcca atgatacgtc aactgaggca tacaacctgc 3900  
 ttctgaggac actggcagga gaaaatcaaa cagcatttga gattgaagag cttaatagga 3960  
 agtatgaaca agcgaagaac atctcacagg atcttgaaaa acaagctgcc cgagtacatg 4020  
 aggaggccaa aaggccgggt gacaaagctg tggagatcta tgccagcgtg gctcagctga 4080  
 gccctttgga ctctgagaca ctggagaatg aagcaataa cataaagatg gaagctgaga 4140  
 atctggaaca actgattgac cagaaattaa aagattatga ggacctcaga gaagatatga 4200  
 gaggaagga acttgaagtc aagaacctt tggagaaagg caagactgaa cagcagaccg 4260  
 cagaccaact cctagcccga gctgatgctg ccaaggccct cgtgaagaa gctgcaaaga 4320  
 aggacggga tacottaca gaagctaag acattctcaa caacctgaaa gattttgata 4380  
 ggcgtgtgaa cgataacaag acggccgcag aggaggcact aaggaagatt cctgccatca 4440  
 accagaccat cactgaagcc aatgaaaaga ccagagaagc ccagcaggcc ctgggcagtg 4500  
 ctgcccggga tgccacagag gccaaagaaca aggccatga ggccgagagg atcgcgagcg 4560  
 ctgtcaaaa gaatgccacc agcaccaagg cagaagctga aagaactttt gcagaagtta 4620  
 cagatctgga taatgaggtg aacaatatgt tgaagcaact gcaggaagca gaaaaagagc 4680  
 taaagagaaa acaagatgac gctgaccagg acatgatgat ggcagggatg gcttcacagg 4740

ES 2 763 433 T3

ctgctcaaga agccgagatc aatgccagaa aagccaaaa ctctgttact agcctcctca 4800  
 gcattattaa tgacctcttg gagcagctgg ggcagctgga tacagtggac ctgaataagc 4860  
 taaacgagat tgaaggcacc ctaaacaag ccaaatgaaga aatgaaggtc agcgatcttg 4920  
 atagaaagt gtctgacctg gagaatgaag ccaagaagca ggaggctgcc atcatggact 4980  
 ataaccgaga tatcgaggag atcatgaagg acattcgoaa tctggaggac atcaggaaga 5040  
 ccttaccatc tggctgcttc aacacccctg ccattgaaaa gccttagtgt ctttagggct 5100  
 ggaaggcagc atccctctga caggggggca gttgtgaggc cacagagtgc cttgacacaa 5160  
 agattacatt tttcagacc ccactcctct gctgctgtcc atgactgtcc ttttgaacca 5220  
 ggaaaagtca cagagtttaa agagaagcaa attaaacatc ctgaatcggg aacaaagggt 5280  
 tttatctaataaagtgtctc ttccattcac gttgctacct taccacact ttccctctg 5340  
 atttgctga ggacgtggca tctacgtta ctgtacagtgc gataagcac atcgtgtgag 5400  
 cccatgatg ctggggtaga gcaagtagcc ctcccctgtc tcatcgatac cagcagaacc 5460  
 tctcagtct cagtactctt gtttctatga aggaaaagt tggctactaa cagtagcatt 5520  
 gtgatggcca gtatatccag tccatggata aagaaaatgc atctgcatct cctaccctc 5580  
 ttcttctaa gaaaaggaa ataaacatcc tgtgcaaag gtattgtca tttagaatgt 5640  
 cggtagccat ccatcagtgc ttttagttat tatgagtga ggacactgag ccatccgtgg 5700  
 gtcaggatgc aattatttat aaaagtctcc aggtgaacat ggctgaagat ttttctagta 5760  
 tattaataat tgactaggaa gatgaacttt tttcagatc tttgggcagc tgataattta 5820  
 aatctggatg ggcagcttg actcaccaat agacaaaag acatctttg atattcttat 5880  
 aatggaact tacacagaag aatagggat atgataacca ctaaaat ttttcaaaa 5940  
 taaaactaat tottacagct tttttattag ttagtcttg aactagtgtt aagtatctgg 6000  
 cagagaacag ttaatcccta aggtcttgac aaaacagaag aaaaacaagc ctctcgtcc 6060  
 tagtctttc tagcaaagg ataaaactta gatggcagct tgtactgca gaatccctg 6120  
 tatccattg ttctctgtt ggagagatga gacatttgac ccttagctcc agttttctc 6180  
 tgatgttcc atcttcaga atccctcaa aaacattgtt tgccaaatcc tggtgcaaa 6240  
 tacttgact cagtattca cacagctgcc aacgctatc agttcctgca ctttgtgatt 6300  
 taaatccact ctaaacctc cctctaagt tagaggaag acccttacgt ggagtttct 6360  
 agtgggctc tcaactttg atctcagct ctgtggttt aagaccacag tgtgacagtt 6420  
 cctgccaca cacccttc ctctacca cccaccttg agattcatat atagcctta 6480  
 acactatgca actttgtact ttgcgtagca gggcggggt ggggggaaag aactattat 6540

ES 2 763 433 T3

ctgacacact ggtgctatta attatttcaa atttatattt ttgtgtgaat gttttgtgtt 6600  
 ttgtttatca tgattataga ataaggaatt tatgtaaata tacttagtcc tattttctaga 6660  
 atgacactct gttcactttg ctcaattttt cctcttcaact ggcacaatgt atctgaatac 6720  
 ctctttccct cctttctaga attcitttga ttgtactcca aagaattgtg ccttgtgttt 6780  
 gcagcatctc catttcttaa aattaatata attgctttcc tccacacca gccactgtaa 6840  
 agaggtaact tgggtcctct tccattgcag tctgatgat cctaacctgc agcacgggtg 6900  
 tttacaatg ttccagagca ggaacgccag gttgacaagc tatggtagga ttaggaaagt 6960  
 ttgctgaaga ggatctttga cgccacagtg ggactagcca ggaatgaggg agaaatgcc 7020  
 tttctggcaa ttgttggagc tggatagta agttttataa gggagtacat tttgactgag 7080  
 cacttagggc atcaggaaca gtgctactta ctgatgggta gactgggaga ggtggtgtaa 7140  
 cttagtctt gatgatccca cttctgttt ccatctgctt gggatatacc agagtttacc 7200  
 acaagtgttt tgacgatata ctctgagct ttcactotgc tgcttctccc aggctcttc 7260  
 tactatggca ggagatgtgg cgtgctgtg caaagtttc acgtcattgt ttcctggcta 7320  
 gttcatttca ttaagtggct acatcctaac atatgcattt ggtaagggtt gcagaagagg 7380  
 actgaagatt gactgccaag ctagtgtgg tgaagttcac tccagcaagt ctcaggccac 7440  
 aatgggggtg tttggtttg tttccttta actttctttt tgttatttgc tttctctc 7500  
 cacctgtgtg gtatatttt taagcagaat tttattttt aaaataaaag gttctttaca 7560  
 agatgatacc ttaattacac tccgcaaca cagccattat tttattgtct agctccagtt 7620  
 atctgtattt tatgtaatgt aattgacagg atggctgctg cagaatgctg gttgacacag 7680  
 ggattattat actgctattt ttccctgaat tttttcctt tgaattccaa ctgtggacct 7740  
 tttatatgtg ccttcacttt agctgtttgc cttaatctct acagccttgc tctccggggt 7800  
 ggtaataaaa atgcaacact tggcatttt atgttttaag aaaaacagta tttattttat 7860  
 aataaaatct gaatatttgt aacccttta 7889

<210> 8  
 <211> 1609  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

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

ES 2 763 433 T3

Leu Trp Pro Val Leu Ala Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys  
 20 25 30

Ala Gln Ala Ala Met Asp Glu Cys Thr Asp Glu Gly Gly Arg Pro Gln  
 35 40 45

Arg Cys Met Pro Glu Phe Val Asn Ala Ala Phe Asn Val Thr Val Val  
 50 55 60

Ala Thr Asn Thr Cys Gly Thr Pro Pro Glu Glu Tyr Cys Val Gln Thr  
 65 70 75 80

Gly Val Thr Gly Val Thr Lys Ser Cys His Leu Cys Asp Ala Gly Gln  
 85 90 95

Pro His Leu Gln His Gly Ala Ala Phe Leu Thr Asp Tyr Asn Asn Gln  
 100 105 110

Ala Asp Thr Thr Trp Trp Gln Ser Gln Thr Met Leu Ala Gly Val Gln  
 115 120 125

Tyr Pro Ser Ser Ile Asn Leu Thr Leu His Leu Gly Lys Ala Phe Asp  
 130 135 140

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

Ala Ile Tyr Lys Arg Thr Arg Glu Asp Gly Pro Trp Ile Pro Tyr Gln  
 165 170 175

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

Phe Ile Arg Thr Gly Gly Asp Glu Gln Gln Ala Leu Cys Thr Asp Glu  
 195 200 205

Phe Ser Asp Ile Ser Pro Leu Thr Gly Gly Asn Val Ala Phe Ser Thr  
 210 215 220

Leu Glu Gly Arg Pro Ser Ala Tyr Asn Phe Asp Asn Ser Pro Val Leu  
 225 230 235 240

Gln Glu Trp Val Thr Ala Thr Asp Ile Arg Val Thr Leu Asn Arg Leu  
 245 250 255

ES 2 763 433 T3

Asn Thr Phe Gly Asp Glu Val Phe Asn Asp Pro Lys Val Leu Lys Ser  
 260 265 270

Tyr Tyr Tyr Ala Ile Ser Asp Phe Ala Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys  
 275 280 285

Asn Gly His Ala Ser Glu Cys Met Lys Asn Glu Phe Asp Lys Leu Val  
 290 295 300

Cys Asn Cys Lys His Asn Thr Tyr Gly Val Asp Cys Glu Lys Cys Leu  
 305 310 315 320

Pro Phe Phe Asn Asp Arg Pro Trp Arg Arg Ala Thr Ala Glu Ser Ala  
 325 330 335

Ser Glu Cys Leu Pro Cys Asp Cys Asn Gly Arg Ser Gln Glu Cys Tyr  
 340 345 350

Phe Asp Pro Glu Leu Tyr Arg Ser Thr Gly His Gly Gly His Cys Thr  
 355 360 365

Asn Cys Gln Asp Asn Thr Asp Gly Ala His Cys Glu Arg Cys Arg Glu  
 370 375 380

Asn Phe Phe Arg Leu Gly Asn Asn Glu Ala Cys Ser Ser Cys His Cys  
 385 390 395 400

Ser Pro Val Gly Ser Leu Ser Thr Gln Cys Asp Ser Tyr Gly Arg Cys  
 405 410 415

Ser Cys Lys Pro Gly Val Met Gly Asp Lys Cys Asp Arg Cys Gln Pro  
 420 425 430

Gly Phe His Ser Leu Thr Glu Ala Gly Cys Arg Pro Cys Ser Cys Asp  
 435 440 445

Pro Ser Gly Ser Ile Asp Glu Cys Asn Ile Glu Thr Gly Arg Cys Val  
 450 455 460

Cys Lys Asp Asn Val Glu Gly Phe Asn Cys Glu Arg Cys Lys Pro Gly  
 465 470 475 480

Phe Phe Asn Leu Glu Ser Ser Asn Pro Arg Gly Cys Thr Pro Cys Phe  
 485 490 495

ES 2 763 433 T3

Cys Phe Gly His Ser Ser Val Cys Thr Asn Ala Val Gly Tyr Ser Val  
 500 505 510

Tyr Ser Ile Ser Ser Thr Phe Gln Ile Asp Glu Asp Gly Trp Arg Ala  
 515 520 525

Glu Gln Arg Asp Gly Ser Glu Ala Ser Leu Glu Trp Ser Ser Glu Arg  
 530 535 540

Gln Asp Ile Ala Val Ile Ser Asp Ser Tyr Phe Pro Arg Tyr Phe Ile  
 545 550 555 560

Ala Pro Ala Lys Phe Leu Gly Lys Gln Val Leu Ser Tyr Gly Gln Asn  
 565 570 575

Leu Ser Phe Ser Phe Arg Val Asp Arg Arg Asp Thr Arg Leu Ser Ala  
 580 585 590

Glu Asp Leu Val Leu Glu Gly Ala Gly Leu Arg Val Ser Val Pro Leu  
 595 600 605

Ile Ala Gln Gly Asn Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Thr Val Lys Tyr Val  
 610 615 620

Phe Arg Leu His Glu Ala Thr Asp Tyr Pro Trp Arg Pro Ala Leu Thr  
 625 630 635 640

Pro Phe Glu Phe Gln Lys Leu Leu Asn Asn Leu Thr Ser Ile Lys Ile  
 645 650 655

Arg Gly Thr Tyr Ser Glu Arg Ser Ala Gly Tyr Leu Asp Asp Val Thr  
 660 665 670

Leu Ala Ser Ala Arg Pro Gly Pro Gly Val Pro Ala Thr Trp Val Glu  
 675 680 685

Ser Cys Thr Cys Pro Val Gly Tyr Gly Gly Gln Phe Cys Glu Met Cys  
 690 695 700

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

Cys Val Leu Cys Ala Cys Asn Gly His Ser Glu Thr Cys Asp Pro Glu



ES 2 763 433 T3

Thr Gly Gln His Cys Glu Arg Cys Glu Val Asn His Phe Gly Phe Gly  
 965 970 975

Pro Glu Gly Cys Lys Pro Cys Asp Cys His Pro Glu Gly Ser Leu Ser  
 980 985 990

Leu Gln Cys Lys Asp Asp Gly Arg Cys Glu Cys Arg Glu Gly Phe Va  
 995 1000 1005

Gly Asn Arg Cys Asp Gln Cys Glu Glu Asn Tyr Phe Tyr Asn Arg  
 1010 1015 1020

Ser Trp Pro Gly Cys Gln Glu Cys Pro Ala Cys Tyr Arg Leu Val  
 1025 1030 1035

Lys Asp Lys Val Ala Asp His Arg Val Lys Leu Gln Glu Leu Glu  
 1040 1045 1050

Ser Leu Ile Ala Asn Leu Gly Thr Gly Asp Glu Met Val Thr Asp  
 1055 1060 1065

Gln Ala Phe Glu Asp Arg Leu Lys Glu Ala Glu Arg Glu Val Met  
 1070 1075 1080

Asp Leu Leu Arg Glu Ala Gln Asp Val Lys Asp Val Asp Gln Asn  
 1085 1090 1095

Leu Met Asp Arg Leu Gln Arg Val Asn Asn Thr Leu Ser Ser Gln  
 1100 1105 1110

Ile Ser Arg Leu Gln Asn Ile Arg Asn Thr Ile Glu Glu Thr Gly  
 1115 1120 1125

Asn Leu Ala Glu Gln Ala Arg Ala His Val Glu Asn Thr Glu Arg  
 1130 1135 1140

Leu Ile Glu Ile Ala Ser Arg Glu Leu Glu Lys Ala Lys Val Ala  
 1145 1150 1155

Ala Ala Asn Val Ser Val Thr Gln Pro Glu Ser Thr Gly Asp Pro  
 1160 1165 1170

Asn Asn Met Thr Leu Leu Ala Glu Glu Ala Arg Lys Leu Ala Glu  
 1175 1180 1185

ES 2 763 433 T3

Arg His Lys Gln Glu Ala Asp Asp Ile Val Arg Val Ala Lys Thr  
 1190 1195 1200

Ala Asn Asp Thr Ser Thr Glu Ala Tyr Asn Leu Leu Leu Arg Thr  
 1205 1210 1215

Leu Ala Gly Glu Asn Gln Thr Ala Phe Glu Ile Glu Glu Leu Asn  
 1220 1225 1230

Arg Lys Tyr Glu Gln Ala Lys Asn Ile Ser Gln Asp Leu Glu Lys  
 1235 1240 1245

Gln Ala Ala Arg Val His Glu Glu Ala Lys Arg Ala Gly Asp Lys  
 1250 1255 1260

Ala Val Glu Ile Tyr Ala Ser Val Ala Gln Leu Ser Pro Leu Asp  
 1265 1270 1275

Ser Glu Thr Leu Glu Asn Glu Ala Asn Asn Ile Lys Met Glu Ala  
 1280 1285 1290

Glu Asn Leu Glu Gln Leu Ile Asp Gln Lys Leu Lys Asp Tyr Glu  
 1295 1300 1305

Asp Leu Arg Glu Asp Met Arg Gly Lys Glu Leu Glu Val Lys Asn  
 1310 1315 1320

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

Leu Ala Arg Ala Asp Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Glu Ala Ala  
 1340 1345 1350

Lys Lys Gly Arg Asp Thr Leu Gln Glu Ala Asn Asp Ile Leu Asn  
 1355 1360 1365

Asn Leu Lys Asp Phe Asp Arg Arg Val Asn Asp Asn Lys Thr Ala  
 1370 1375 1380

Ala Glu Glu Ala Leu Arg Lys Ile Pro Ala Ile Asn Gln Thr Ile  
 1385 1390 1395

Thr Glu Ala Asn Glu Lys Thr Arg Glu Ala Gln Gln Ala Leu Gly  
 1400 1405 1410

ES 2 763 433 T3

Ser Ala Ala Ala Asp Ala Thr Glu Ala Lys Asn Lys Ala His Glu  
 1415 1420 1425

Ala Glu Arg Ile Ala Ser Ala Val Gln Lys Asn Ala Thr Ser Thr  
 1430 1435 1440

Lys Ala Glu Ala Glu Arg Thr Phe Ala Glu Val Thr Asp Leu Asp  
 1445 1450 1455

Asn Glu Val Asn Asn Met Leu Lys Gln Leu Gln Glu Ala Glu Lys  
 1460 1465 1470

Glu Leu Lys Arg Lys Gln Asp Asp Ala Asp Gln Asp Met Met Met  
 1475 1480 1485

Ala Gly Met Ala Ser Gln Ala Ala Gln Glu Ala Glu Ile Asn Ala  
 1490 1495 1500

Arg Lys Ala Lys Asn Ser Val Thr Ser Leu Leu Ser Ile Ile Asn  
 1505 1510 1515

Asp Leu Leu Glu Gln Leu Gly Gln Leu Asp Thr Val Asp Leu Asn  
 1520 1525 1530

Lys Leu Asn Glu Ile Glu Gly Thr Leu Asn Lys Ala Lys Asp Glu  
 1535 1540 1545

Met Lys Val Ser Asp Leu Asp Arg Lys Val Ser Asp Leu Glu Asn  
 1550 1555 1560

Glu Ala Lys Lys Gln Glu Ala Ala Ile Met Asp Tyr Asn Arg Asp  
 1565 1570 1575

Ile Glu Glu Ile Met Lys Asp Ile Arg Asn Leu Glu Asp Ile Arg  
 1580 1585 1590

Lys Thr Leu Pro Ser Gly Cys Phe Asn Thr Pro Ser Ile Glu Lys  
 1595 1600 1605

Pro

<210> 9  
 <211> 22

# ES 2 763 433 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 1 de laminina	
5	<400> 9 gagtccgtct ctctggacat ag	22
	<210> 10	
	<211> 21	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 1 de laminina	
	<400> 10 cgtggcattc acagggtga c	21
15	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 2 de laminina	
	<400> 11 tgctagaatt tacctccgct cg	22
	<210> 12	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 2 de laminina	
	<400> 12 gatcaagtgg acaagccctg	20
30	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 3 de laminina	
	<400> 13 ctcaaaggc ccaactcaag	20
	<210> 14	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 3 de laminina	
45	<400> 14 ccataactgc ctccttagtc tc	22
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 763 433 T3

	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 4 de laminina	
	<400> 15	
	cttacgcaac accaccggat tc	22
5	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 4 de laminina	
	<400> 16	
	ccttctcca agcattctcc g	21
	<210> 17	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 5 de laminina	
	<400> 17	
20	gaggactgaa gtgaaaactc aa	22
	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 5 de laminina	
	<400> 18	
	ccactgaagt tgtaaatggt g	21
	<210> 19	
30	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena beta 1 de laminina	
35	<400> 19	
	gatggtgaac ttgatgaaa gt	22
	<210> 20	
	<211> 22	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena beta 1 de laminina	
	<400> 20	
	ggcttatatc cttaggagt ga	22
45	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena beta 2 de laminina	

# ES 2 763 433 T3

	<400> 21 gatgatcgca tccaagggac	20
5	<210> 22 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena beta 2 de laminina	
10	<400> 22 gtccagagta gggagtctca g	21
	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencia del cebador directo de la cadena beta 3 de laminina	
	<400> 23 cccagatgga ggaagatgctc	20
20	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena beta 3 de laminina	
25	<400> 24 gtagctgagt ctgtgggcag	20
	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia del cebador directo de la cadena beta 4 de laminina	
	<400> 25 ggcaggctac ttggatttc	20
35	<210> 26 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena beta 4 de laminina	
	<400> 26 gcttgagga tcatctggac	20
45	<210> 27 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia del cebador directo de la cadena gamma 1 de laminina	
50	<400> 27 gatgagatgg tgacagatca ag	22

# ES 2 763 433 T3

	<210> 28	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena gamma 1 de laminina	
	<400> 28	
	ttccagtct cttcaatggt at	22
10	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena gamma 2 de laminina	
15	<400> 29	
	atcgaagggt actgcggaat c	21
20	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena gamma 2 de laminina	
	<400> 30	
	gtagccagaa gcacaatcct g	21
25	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena gamma 3 de laminina	
	<400> 31	
	gggatacaag agggagatgc	20
35	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena gamma 3 de laminina	
	<400> 32	
40	catagaaacc tggcaaacag c	21
	<210> 33	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 1 de integrina	
	<400> 33	
	gaagaacctc ctgaaacct tt	22
50	<210> 34	
	<211> 22	
	<212> ADN	

# ES 2 763 433 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 1 de integrina	
5	<400> 34 tgatgtcata ttggggaatg aa	22
	<210> 35	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 2 de integrina	
	<400> 35 tgatgggaca gaagtaacat gc	22
	<210> 36	
15	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 2 de integrina	
20	<400> 36 tggaccaaca tctcaaac tg	22
	<210> 37	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 3 de integrina	
	<400> 37 gctctgcctt tggttatct gt	22
30	<210> 38	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 3 de integrina	
	<400> 38 ttcccactag aaggctctggg ta	22
	<210> 39	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 4 de integrina	
45	<400> 39 atattcagtc ggagctggtc at	22
	<210> 40	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

# ES 2 763 433 T3

<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 4 de integrina  
 <400> 40  
 gcatattgt cactccaac ga 22  
 <210> 41  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 5 de integrina  
 <400> 41  
 tcctcagcaa gaatccaac aa 22  
 <210> 42  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 5 de integrina  
 <400> 42  
 gttgagtccc gtaactctgg tc 22  
 <210> 43  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 6 de integrina  
 <400> 43  
 agcaaggcag atggaataat gt 22  
 <210> 44  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 6 de integrina  
 <400> 44  
 caggtagga attcgatca ag 22  
 <210> 45  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 7 de integrina  
 <400> 45  
 caggtcacct tctacctcat cc 22  
 <210> 46  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 7 de integrina  
 <400> 46

# ES 2 763 433 T3

	accgtgacct catacttgac ct	22
	<210> 47	
	<211> 22	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 8 de integrina	
	<400> 47	
	atggaaaatg taaccaggat gg	22
10	<210> 48	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 8 de integrina	
	<400> 48	
	cagttatgaa tgggcagaac aa	22
	<210> 49	
	<211> 22	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 9 de integrina	
	<400> 49	
25	cactttcagc ccatcaatat ca	22
	<210> 50	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 9 de integrina	
	<400> 50	
	acagtggtct gttaggcaag aa	22
	<210> 51	
35	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 10 de integrina	
40	<400> 51	
	atcagtggtg ttcagaggga ct	22
	<210> 52	
	<211> 22	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 10 de integrina	
	<400> 52	
	gccctggctt tgtagtattg tc	22
50	<210> 53	

# ES 2 763 433 T3

	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa 11 de integrina	
	<400> 53	
	ggacactgct gactacgtga ag	22
	<210> 54	
10	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa 11 de integrina	
15	<400> 54	
	gcgtgtgctc tctatgatga ag	22
	<210> 55	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa E de integrina	
	<400> 55	
	tagcagtga gaagctgacg ag	22
25	<210> 56	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa-E de integrina	
30	<400> 56	
	tcttcagga agacgacagt ga	22
	<210> 57	
35	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa V de integrina	
	<400> 57	
	atctgtgagg tcgaaacagg at	22
40	<210> 58	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa-V de integrina	
	<400> 58	
	accttgcaa taaaagctac ca	22
	<210> 59	
50	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

# ES 2 763 433 T3

<220>  
 <223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa L de integrina  
  
 <400> 59  
 gaaccattga caccagaagt ga 22  
 5 <210> 60  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa-L de integrina  
 10 <400> 60  
 ttctcaaac cccaactgctc tt 22  
  
 <210> 61  
 <211> 22  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa M de integrina  
 20 <400> 61  
 gatcggctaa gagaaggaca ga 22  
  
 <210> 62  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa-M de integrina  
  
 <400> 62  
 cattgccaca attctctca aa 22  
 30 <210> 63  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa X de integrina  
 35 <400> 63  
 ccaacatctg cctttacatt ga 22  
  
 <210> 64  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa-X de integrina  
  
 <400> 64  
 cgtgaagtat ctctgagcat cg 22  
 45 <210> 65  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa D de integrina  
 50

# ES 2 763 433 T3

	<400> 65 ttaaccagat gaagggcttt gt	22
5	<210> 66 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa-D de integrina	
10	<400> 66 ggtctttgta ctctgcca tc	22
	<210> 67 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencia del cebador directo de la cadena alfa-IIb de integrina	
	<400> 67 gaaaagactg aggaggctga ga	22
20	<210> 68 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena alfa-IIb de integrina	
25	<400> 68 gagaaaatat cgcgaactgg ag	22
	<210> 69 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia del cebador directo de la cadena beta 1 de integrina	
	<400> 69 gctgaagact atcccattga cc	22
35	<210> 70 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia del cebador inverso de la cadena beta 1 de integrina	
40	<400> 70 attccagat atgcgctgtt tt	22
	<210> 71 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Secuencia del cebador directo de la cadena beta 2 de integrina	
	<400> 71 tgatggacct ctctactcc at	22
50		



# ES 2 763 433 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena beta 5 de integrina	
5	<400> 78 atcccagact gacaactcca ct	22
	<210> 79	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena beta 6 de integrina	
	<400> 79 tgtgactgtg gtgaatgtgt gt	22
	<210> 80	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena beta 6 de integrina	
20	<400> 80 caccagctag ttgcacttg tc	22
	<210> 81	
	<211> 22	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena beta 7 de integrina	
	<400> 81 cactcagac gacacattcc at	22
30	<210> 82	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena beta 7 de integrina	
	<400> 82 cccaactgca gacttaggaa tc	22
	<210> 83	
	<211> 22	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo de la cadena beta 8 de integrina	
45	<400> 83 gcattatgtc gaccaaactt ca	22
	<210> 84	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

# ES 2 763 433 T3

<223> Secuencia del cebador inverso de la cadena beta 8 de integrina

<400> 84

atttctcag gcttctcag tc 22

5

<210> 85

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador GAPDH-F

10

<400> 85

gagtcaacgg attggtcgt 20

<210> 86

<211> 20

<212> ADN

15

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador GAPDH-R

<400> 86

20

ttgatttgg agggatctcg 20

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un agente seleccionado entre el grupo que consiste en laminina 511, laminina 521 o un fragmento de laminina 511-E8, que se expresa en células endoteliales de la córnea, en un procedimiento para promover *in vitro* el crecimiento de células endoteliales de la córnea.
- 5 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las lamiminas comprenden laminina 511 (alfa5 beta1 gamma1) y laminina 521 (alfa5 beta2 gamma 1).
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que los fragmentos de laminina promueven la capacidad de adhesión celular de las células endoteliales de la córnea.
- 10 4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las células endoteliales de la córnea son de ser humano.
5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el agente está presente en un medio.
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el agente se reviste sobre un recipiente de cultivo.

Fig. 1

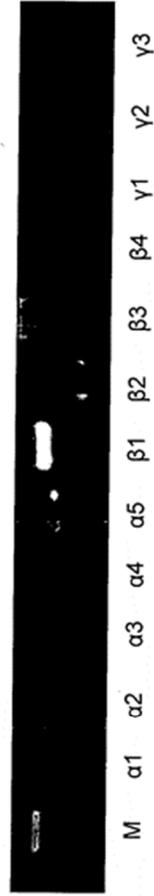
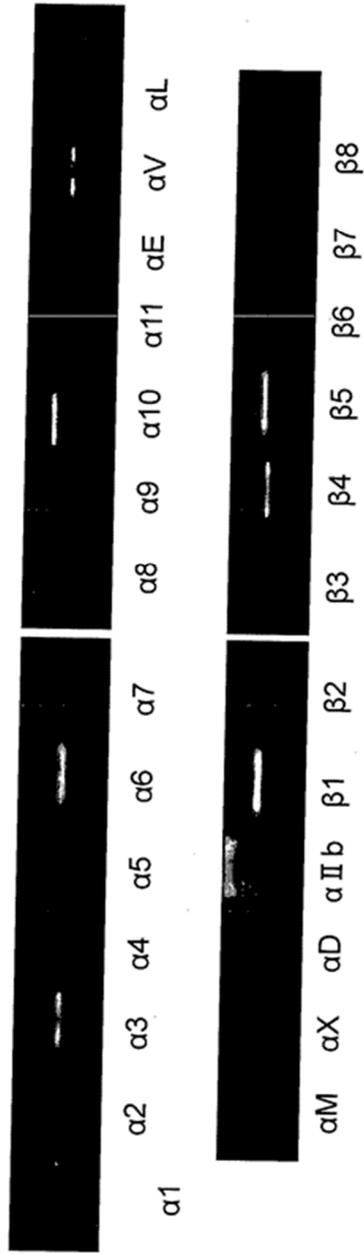
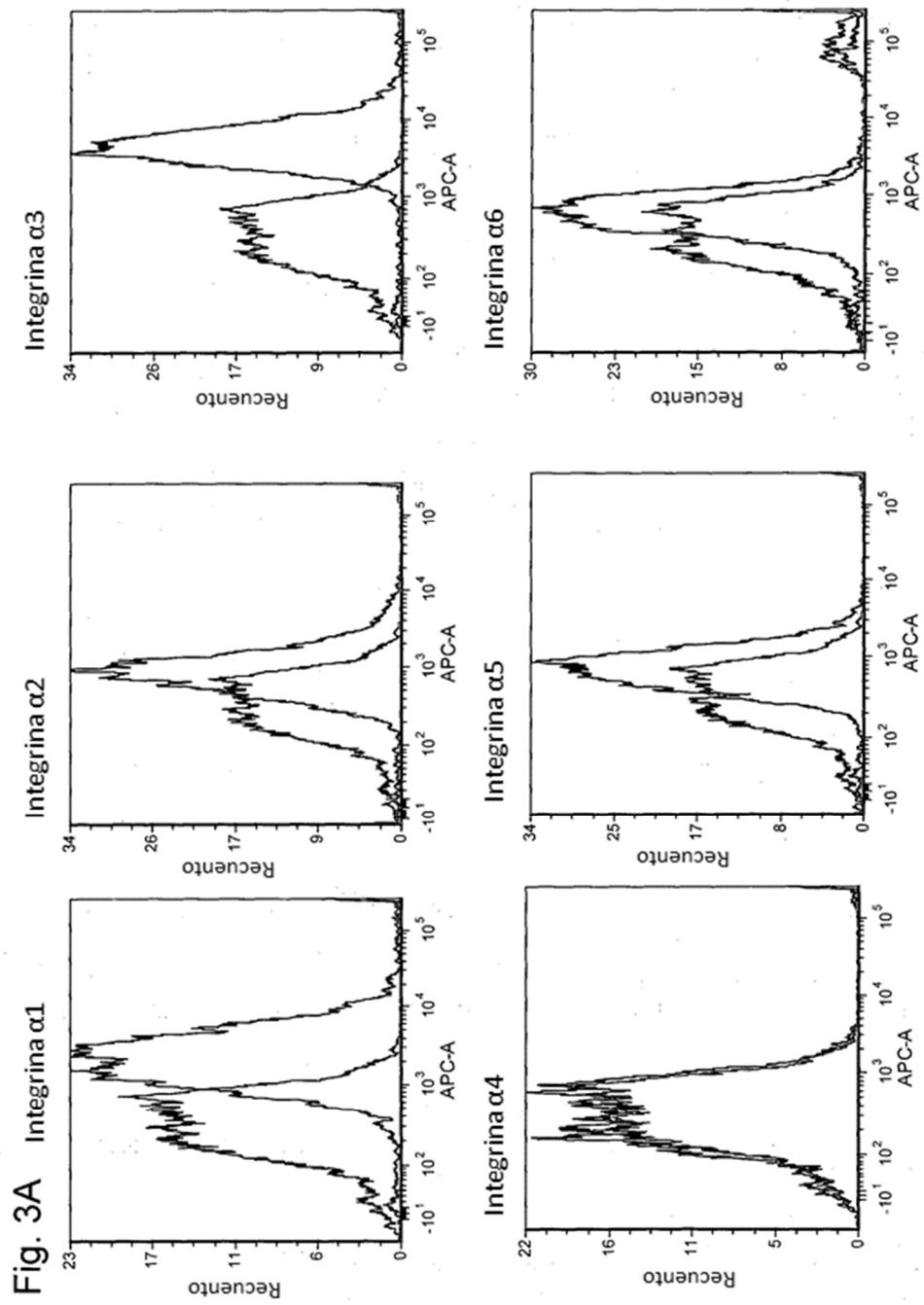
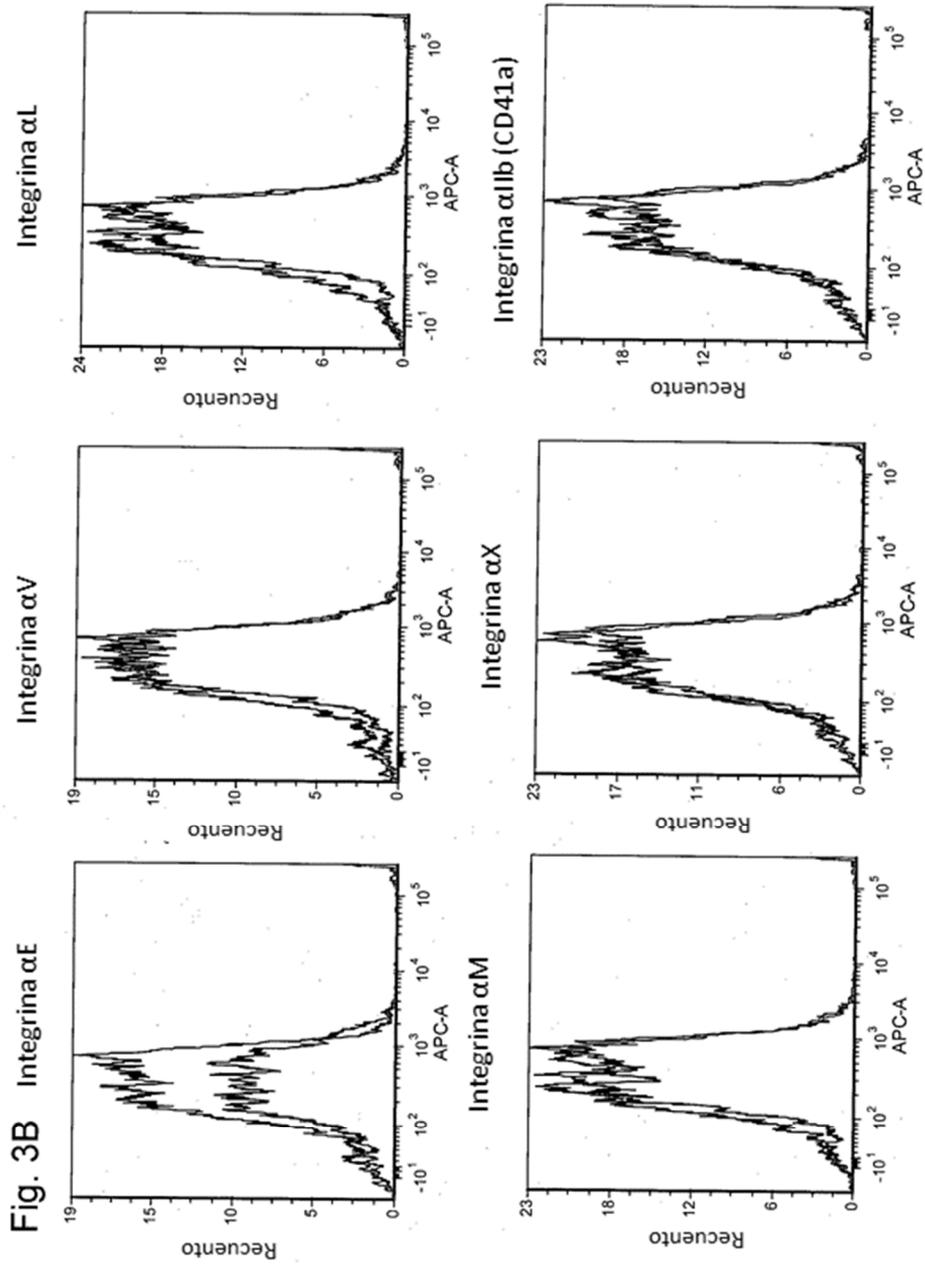
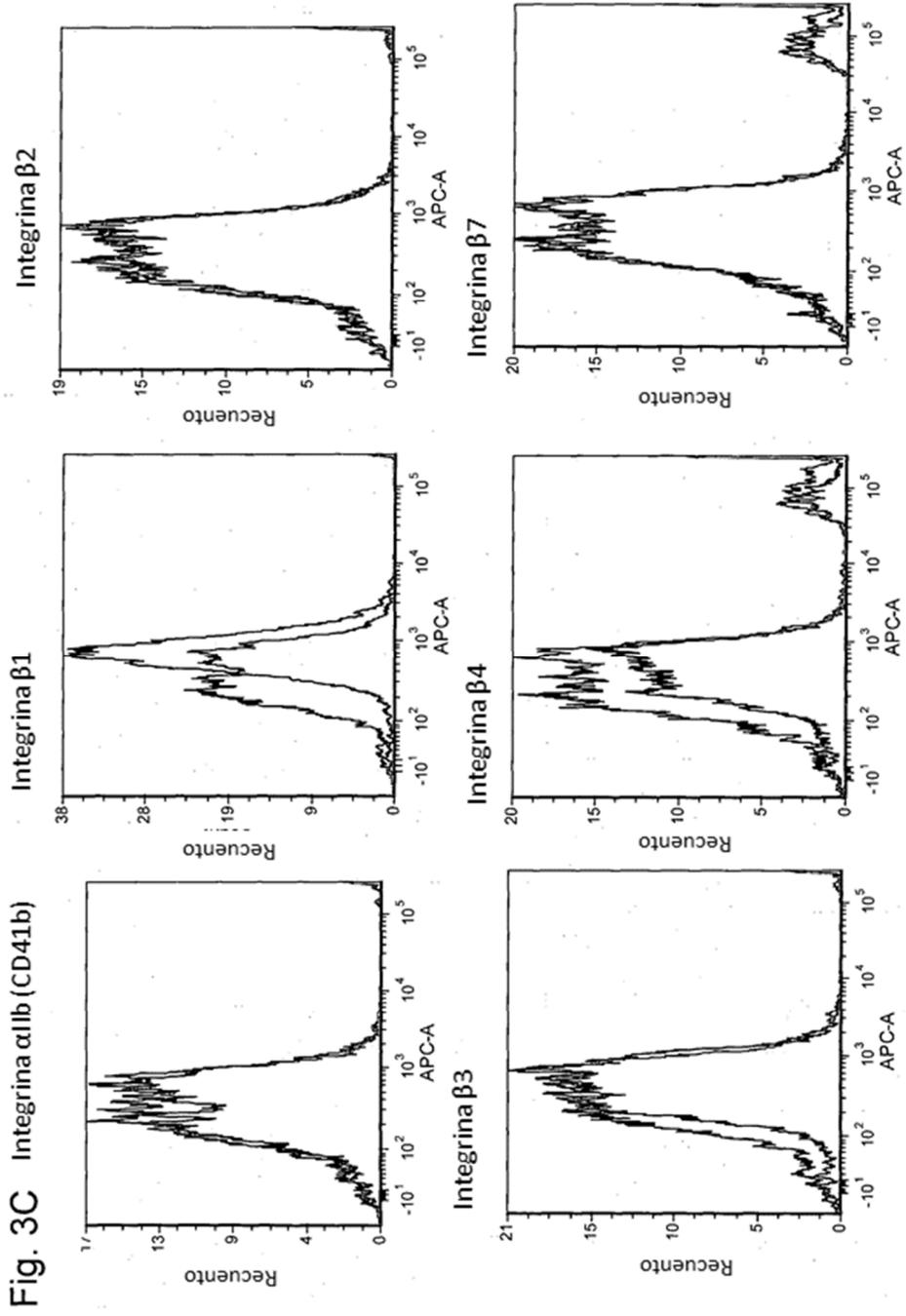


Fig. 2









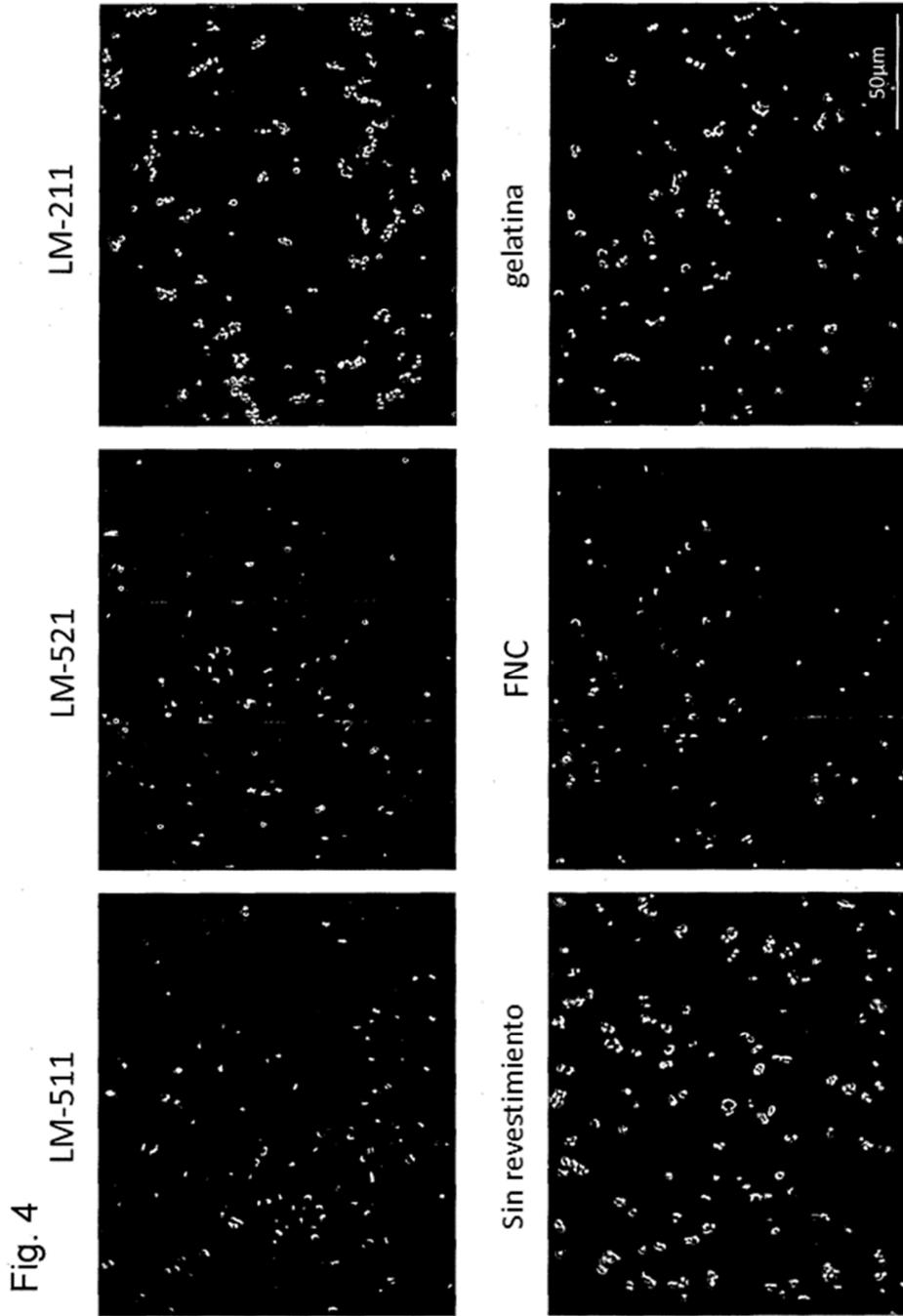


Fig. 5

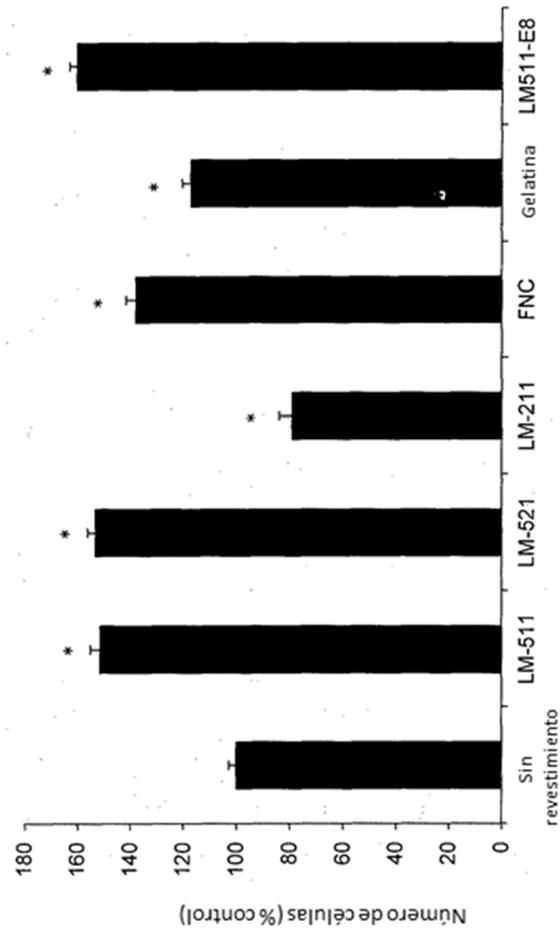


Fig. 6

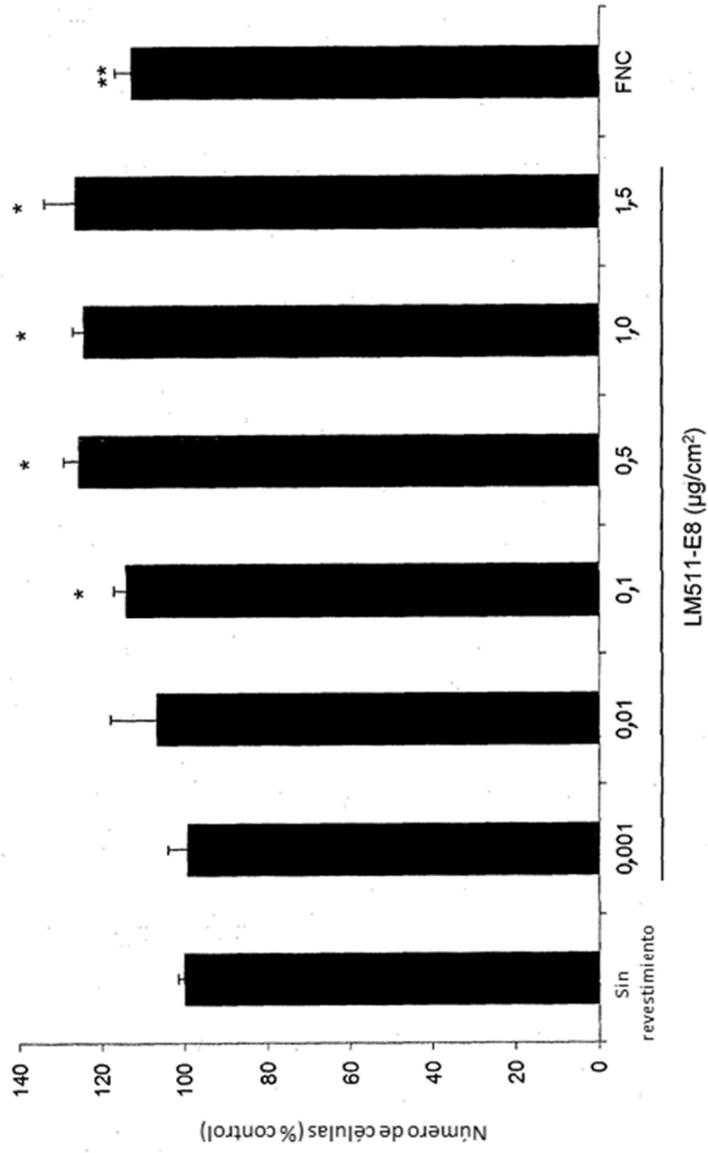
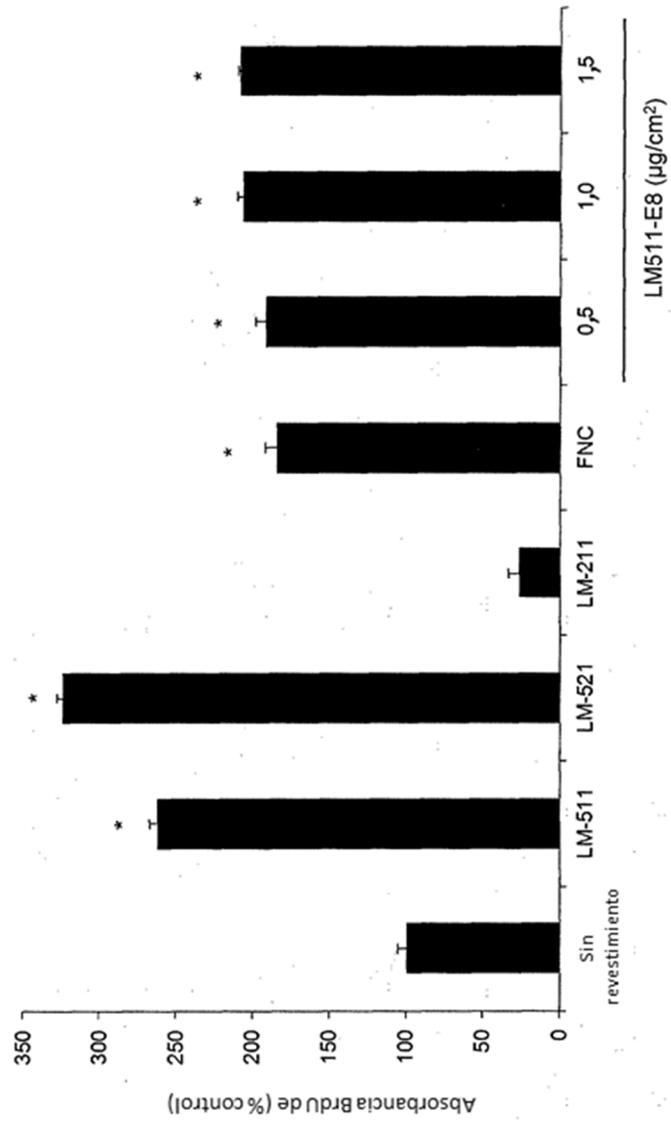
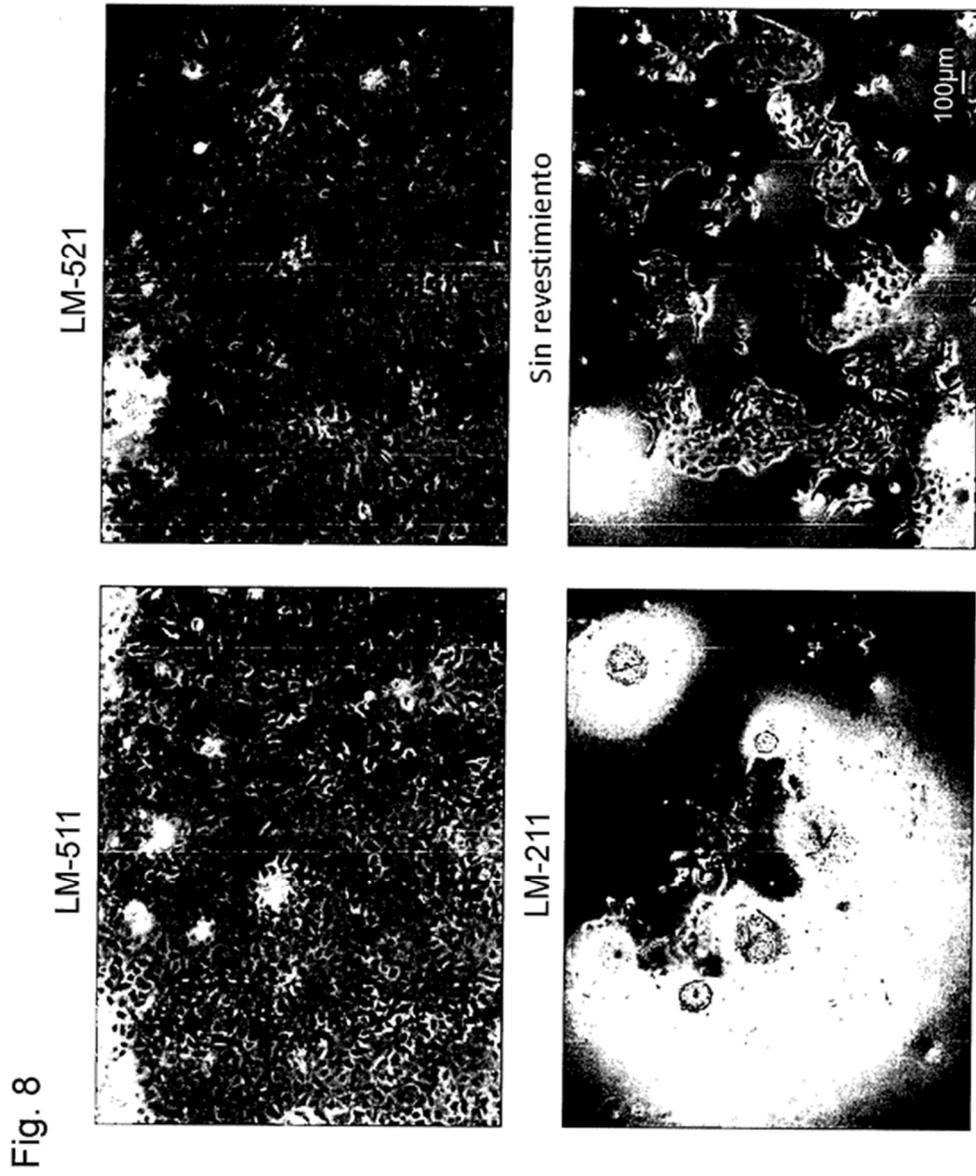
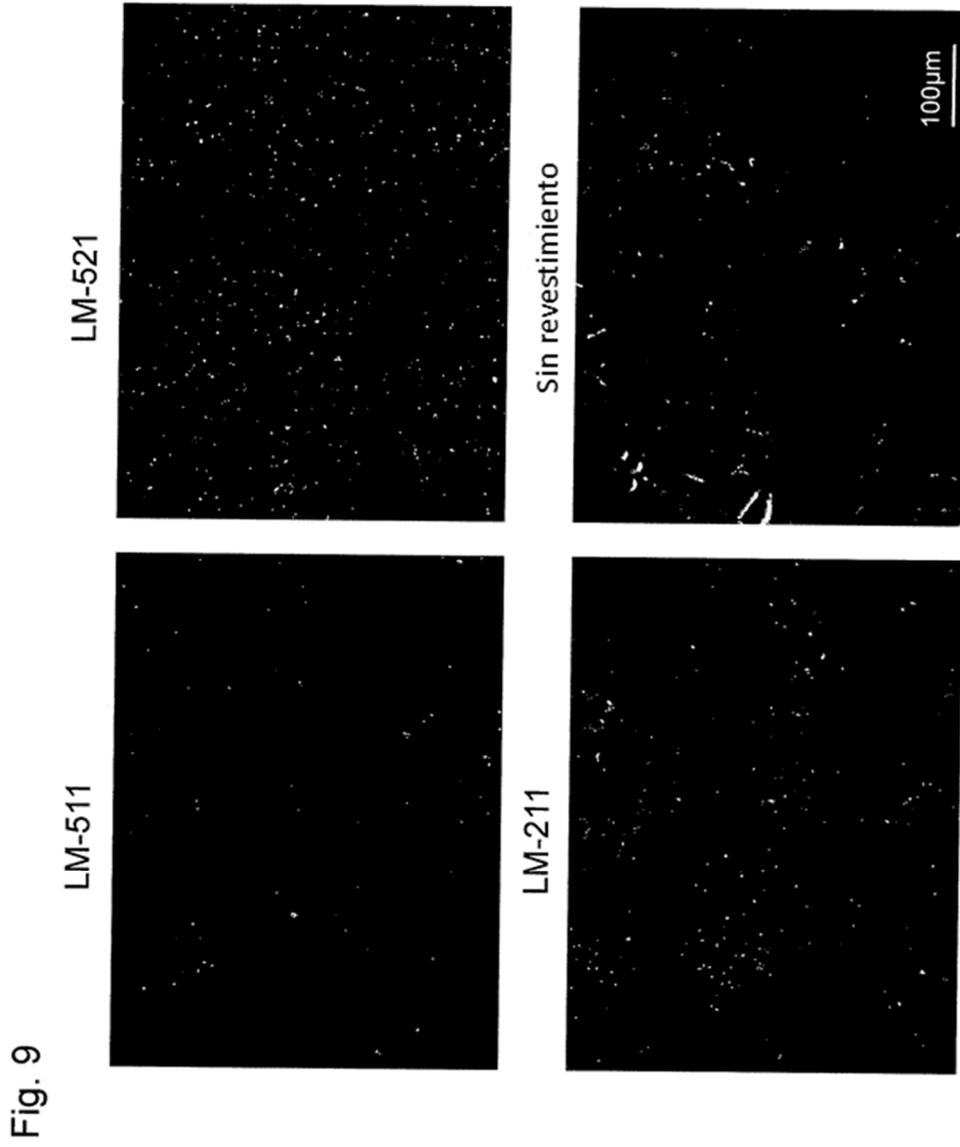
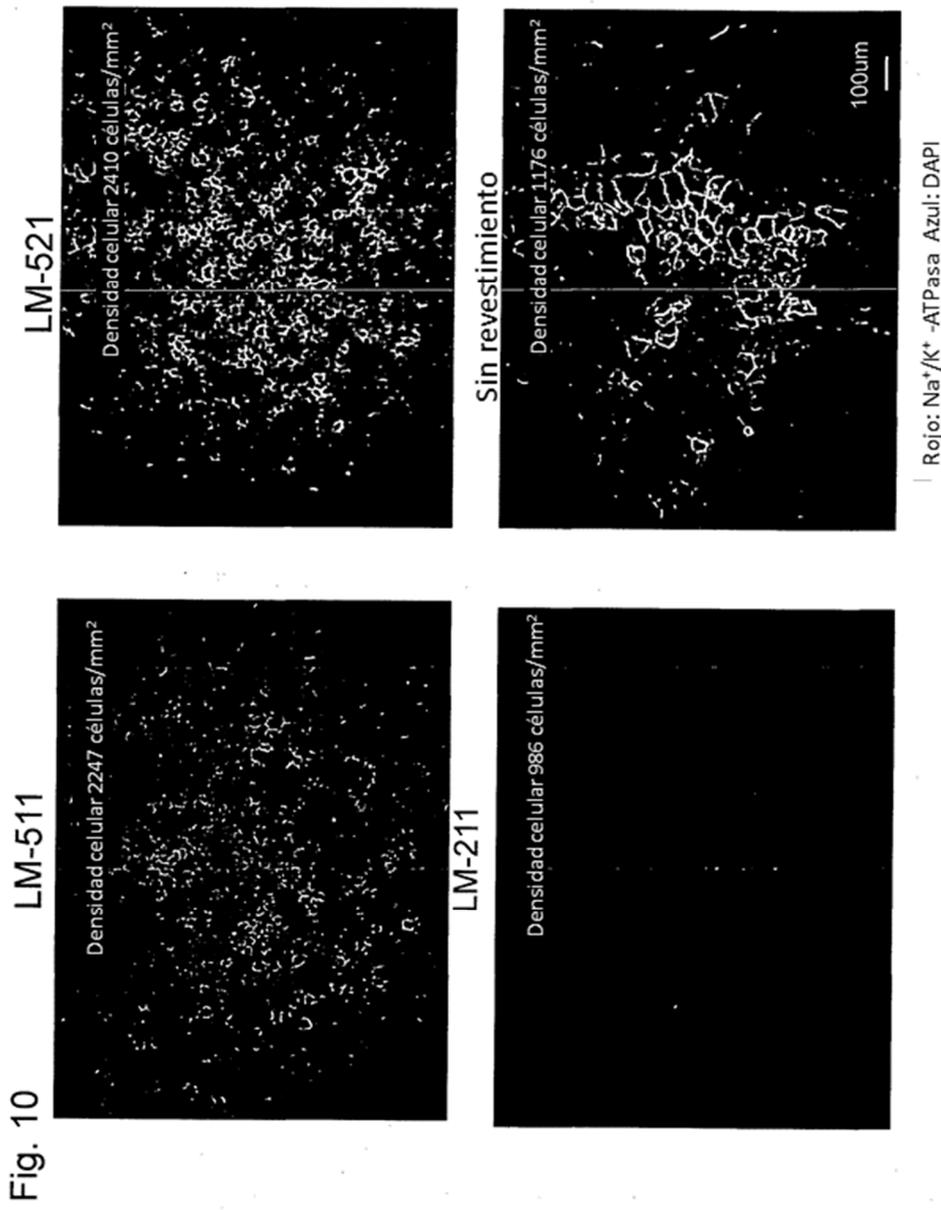


Fig. 7









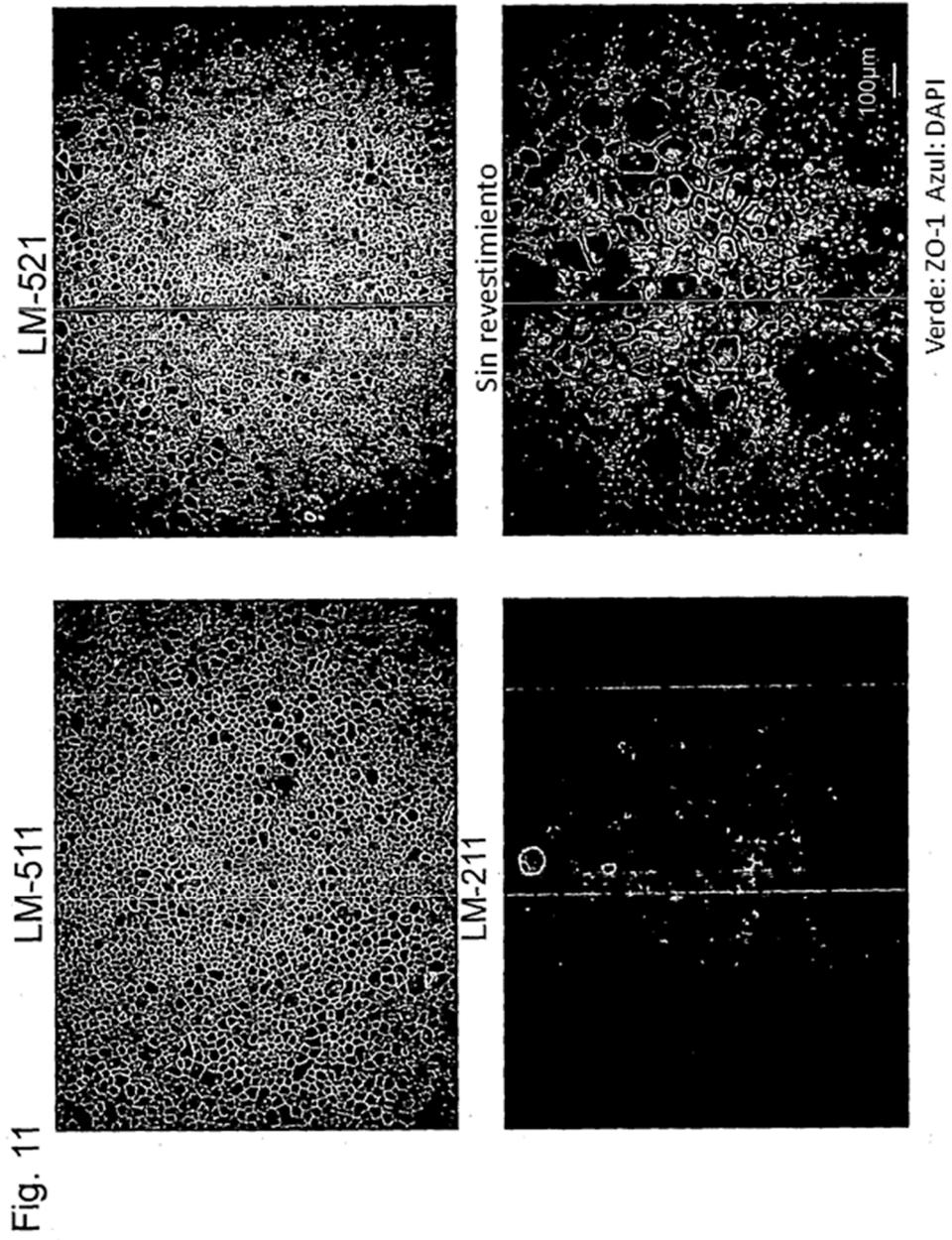


Fig. 11

Fig. 12

