(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 774 972**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2012 PCT/US2012/060263**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13056233**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2012 E 12840725 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 2766044**

(54) Título: **Tratamiento de enfermedades oculares**

(30) Prioridad:

13.10.2011 US 201161546708 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

PETERS, KEVIN y
SHALWITZ, ROBERT

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Tratamiento de enfermedades oculares

Campo de la invención

Métodos para tratar enfermedades o afecciones oculares caracterizadas por neovascularizaciones tales como neovascularizaciones oculares, degeneraciones maculares relacionada con la edad, neovascularizaciones coroideas y retinopatías diabéticas.

El ojo comprende varias capas vasculares estructural y funcionalmente distintas, que suministran componentes oculares críticos para el mantenimiento de la visión. Estas abarcan a las vasculaturas retiniana y coroidea, que irrigan las porciones interna y externa de la retina, respectivamente, y la vasculatura limbal ubicada en la periferia de la córnea. Las lesiones y enfermedades que deterioran la estructura o función normal de estas capas vasculares se encuentran entre las principales causas de la discapacidad visual y la ceguera. Por ejemplo, la retinopatía diabética es la enfermedad más común que afecta la vasculatura retiniana, y es la principal causa de pérdida de visión entre la población en edad laboral en los Estados Unidos. La vascularización de la córnea secundaria frente a una lesión o enfermedad es otra categoría de enfermedad vascular ocular que puede conducir a un deterioro grave de la visión.

La “degeneración macular” es un término médico general que se aplica a cualquiera de diversos síndromes patológicos que implican una pérdida o deterioro gradual de la vista debido a la degeneración celular y tisular de la región macular amarilla en el centro de la retina. La degeneración macular a menudo se caracteriza por alguna de los dos tipos, no exudativa (forma seca) o exudativa (forma húmeda). Aunque ambos tipos son bilaterales y progresivos, cada tipo puede reflejar diferentes procesos patológicos. La forma húmeda de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés) es la forma más común de neovascularización coroidea y una de las principales causas de la ceguera en los ancianos. La AMD afecta a millones de estadounidenses mayores de 60 años y es la principal causa de la nueva ceguera entre los ancianos.

La membrana neovascular coroidea (CNVM) es un problema relacionado con una amplia variedad de enfermedades de la retina, pero está más comúnmente relacionado con la degeneración macular relacionada con la edad. Con la CNVM, los vasos sanguíneos anormales derivados de la coroides (la capa de tejido rica en vasos sanguíneos justo debajo de la retina) crecen a través de las capas retinianas. Estos nuevos vasos son muy frágiles y se rompen fácilmente, haciendo que la sangre y los líquidos se acumulen dentro de las capas de la retina.

La diabetes (diabetes mellitus) es una enfermedad metabólica causada por la incapacidad del páncreas para producir insulina o usar la insulina que se produce. Los tipos más comunes de la diabetes son la diabetes tipo 1 (a menudo denominada diabetes mellitus de inicio juvenil) y la diabetes tipo 2 (a menudo denominada diabetes mellitus de inicio en adultos). La diabetes tipo 1 es el resultado de la incapacidad del cuerpo para producir insulina debido a la pérdida de células productoras de insulina, y actualmente requiere que el paciente se inyecte a sí mismo la insulina. La diabetes tipo 2 generalmente es el resultado de la resistencia a la insulina, una condición en la cual las células no usan la insulina adecuadamente. La diabetes tipo 2 también puede tener un componente de deficiencia de insulina.

La diabetes es directamente responsable de una gran cantidad de afecciones, incluidas algunas afecciones o enfermedades oculares, como la retinopatía diabética (DR) y el edema macular diabético (EMD), que son las principales causas de la pérdida de visión y la ceguera en la mayoría de los países desarrollados. El creciente número de personas con diabetes en todo el mundo sugiere que DR y DME continuarán contribuyendo de manera importante a la pérdida de visión y al deterioro funcional asociado en los años venideros.

La retinopatía diabética es una complicación de la diabetes que es consecuencia del daño a los vasos sanguíneos del tejido sensible a la luz en la parte posterior del ojo (retina). Al principio, la retinopatía diabética puede no causar síntomas o solo problemas leves de visión. Eventualmente, sin embargo, la retinopatía diabética puede provocar ceguera. La retinopatía diabética puede desarrollarse en cualquier persona que tenga diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2.

En sus etapas más tempranas, en la retinopatía no proliferativa, se producen microaneurismas en los capilares de la retina. A medida que la enfermedad progresa, más de estos vasos sanguíneos se dañan o bloquean y estas áreas de la retina envían señales al tejido regional para que crezcan nuevos vasos sanguíneos para nutrirlo. Esta etapa se llama retinopatía proliferativa. Los nuevos vasos sanguíneos crecen a lo largo de la retina y a lo largo de la superficie del gel transparente y vítreo que llena el interior del ojo.

Por sí mismos, estos vasos sanguíneos no causan ningún síntoma ni pérdida de visión. Sin embargo, poseen paredes delgadas y frágiles y, sin un tratamiento oportuno, pueden producirse derrames sanguíneos (sangre entera o algún componente de la misma), lo que puede provocar una pérdida severa de la visión e incluso la ceguera.

Además, pueden filtrarse líquidos al centro de la mácula, la parte del ojo donde se produce una visión nítida y directa. El líquido y la proteína asociada comienzan a depositarse sobre la mácula o debajo de ésta, lo que hace que la visión central del paciente se distorsione. Esta condición se llama edema macular. Puede ocurrir en cualquier

etapa de la retinopatía diabética, aunque es más probable que ocurra a medida que la enfermedad progresa. Alrededor de la mitad de las personas con retinopatía proliferativa también padecen edemas maculares.

La uveítis es una afección en la cual la úvea se inflama. El ojo tiene forma de una pelota de tenis, hueca por dentro con tres capas diferentes de tejido rodeando una cavidad central. La más externa es la esclerótica (capa blanca del ojo) y la más interna es la retina. La capa media entre la esclerótica y la retina se llama úvea. La úvea contiene muchos de los vasos sanguíneos que nutren el ojo. Las complicaciones de la uveítis incluyen glaucoma, cataratas o la formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización).

Las intervenciones actualmente disponibles para la degeneración macular exudativa (forma húmeda), la retinopatía diabética, el edema macular diabético, la membrana neovascular coroidea, las complicaciones de la uveítis o el traumatismo ocular, incluyen terapias de fotocoagulación con láser, dosis bajas de radiación (teleterapia) y extirpación quirúrgica de las membranas neovasculares (vitrectomía) Las terapias con láser han tenido un éxito limitado y las membranas neovasculares coroidales seleccionadas que inicialmente responden a las terapias con láser tienen altas tasas de recurrencia de la enfermedad. También existe una posible pérdida de visión como resultado de la aplicación de las terapias con láser. Las dosis bajas de radiación se han aplicado de manera ineficaz para inducir la regresión de la neovascularización coroidea. Recientemente, los antagonistas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ranibizumab y aflibercept, han sido aprobados para su uso en la degeneración macular relacionada con la edad, el edema macular diabético y la oclusión venosa retiniana (RVO).

La (RVO) es la enfermedad vascular retiniana más común después de la retinopatía diabética. Dependiendo del área de drenaje venoso retiniano ocluido de forma efectiva, se clasifica grosso modo como oclusión venosa retiniana central (CRVO), oclusión venosa retiniana hemisférica (HRVO) u oclusión venosa retiniana ramificada (BRVO). Se ha observado que cada uno de estos tiene dos subtipos. La presentación de RVO en general es con pérdida visual indolora variable con cualquier combinación de hallazgos fundamentales que consisten en tortuosidad vascular retiniana, hemorragias retinianas (formas de manchas y llamas), manchas de algodón, hinchazón del disco óptico y edema macular. En una CRVO, las hemorragias retinianas se encontrarán en los cuatro cuadrantes del fondo, mientras que estas están restringidas al hemisferio fundamental superior o inferior en una HRVO. En una BRVO, las hemorragias se localizan en gran medida en el área drenada por lo ocluido en la vena retiniana.

Por lo tanto, existe una gran necesidad padecida y sustancial de métodos para tratar enfermedades del ojo que se caractericen por el desarrollo de una cierta neovascularización.

Compendio

Según la presente invención, se proporciona un agente de unión al dominio extracelular (ECD) HPTPβ para su uso en la prevención de una enfermedad en el ojo de un sujeto en el que el agente es un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ATCC Nº PTA-7580 o su forma humanizada, donde la enfermedad se previene mediante la reducción de la neovascularización y la enfermedad se selecciona de la retinopatía proliferativa y la degeneración macular relacionada con la edad.

Las realizaciones preferidas se describen en las reivindicaciones adjuntas.

Se describen agentes que se unen a la porción extracelular e inhiben la proteína humana tirosina fosfatasa beta (HPTPβ). También se describen métodos para tratar enfermedades o afecciones oculares caracterizadas por inestabilidad vascular, derrames vasculares y neovascularización como edema ocular, neovascularización ocular, edema macular diabético, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización coroidea, retinopatía diabética, oclusión venosa retiniana (central o ramificada), isquemia ocular, trauma ocular, edema inducido por cirugía y uveítis.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. El anticuerpo monoclonal R15E6 reconoce a HPTPβ endógeno en las células endoteliales. (Panel A). Los lisados de células endoteliales se inmunoprecipitan con un anticuerpo de control (Carril 1), con R15E6 (Carril 2) o con una mezcla de anticuerpos anti-Tie2 y anti-VEGFR2 (Carril 3). Los inmunoprecipitados se resuelven mediante SDS-PAGE, se transfieren a una membrana de PVDF y se analizan mediante transferencia Western con una mezcla de anticuerpos R15E6, anti-Tie2 y anti-VEGFR2. Se observa una única banda principal de alto peso molecular consistente con HPTPβ con R15E6 (Carril 2) y no con el anticuerpo de control (Carril 1) o la mezcla de anti-Tie2 y anti-VEGFR2 (Carril 3). (Panel B) Las células endoteliales se someten a análisis FACS con R15E6 (pico blanco) o un control sin anticuerpo primario (pico negro). El fuerte cambio en la fluorescencia indica que R15E6 se une a HPTPβ en la superficie de las células endoteliales intactas.

Fig. 2. El anticuerpo monoclonal R15E6 mejora la activación del receptor Tie2 en HUVEC. La activación de Tie2 se mide en células endoteliales humanas como se describe en el Ejemplo 4. La dosis de R15E6 mejora de forma dependiente la activación de Tie2 tanto basal como inducida por Ang1.

La Fig. 3 es una representación gráfica del área media de la neovascularización coroidea en ratones C57BL/6 14 días después de la lesión por láser en ojos tratados con inyección intravítrea de 1 µg o 2 µg de un anticuerpo de dominio extracelular anti-VE-PTP en un ojo versus tratamiento similar del otro ojo con control.

La Fig. 4 muestra el área media (mm^2) de la neovascularización retiniana en ratones C57BL/6 el día P17 después de la contención en una atmósfera de oxígeno al 75% de P5 a P12 y la inyección intravítrea de un anticuerpo de dominio extracelular anti-VE-PTP en P12 una vez los ratones fueron devueltos a la atmósfera ambiente.

La Fig. 5 muestra micrografías fluorescentes representativas de retinas de ratón en el modelo de retinopatía inducida por oxígeno después de la inyección intravítrea del vehículo o de 2 µg de un anticuerpo de dominio extracelular anti-VE-PTP.

La Fig. 6 muestra el área media (mm^2) de la neovascularización retiniana en ratones C57BL/6 el día P17 después de la contención en una atmósfera de oxígeno al 75% de P5 a P12 seguido de retorno a una atmósfera ambiente en P12 con administración subcutánea de 1 mg / kg de un anticuerpo de dominio extracelular anti-VE-PTP en los días P12, 14 y 16.

La Fig. 7 muestra el área media (mm^2) de la neovascularización retiniana en ratones C57BL/6 el día P17 después de la contención en una atmósfera de oxígeno al 75% de P5 a P12 seguido de la vuelta a una atmósfera ambiente en P12 con administración subcutánea de 2 mg / kg de un anticuerpo de dominio extracelular anti-VE-PTP en los días P12, 14 y 16.

Descripción detallada

Definiciones generales

En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos y expresiones que serán definidas con los siguientes significados:

La expresión "agente de unión a HPTPβ-ECD" y "agente de unión específico" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una molécula que se une específicamente a la porción extracelular de HPTPβ, y sus variantes y derivados, como se define en el presente documento y que inhibe la actividad desfosforilasa Tie2 de HPTPβ.

"Agente", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un "agente de unión a HPTPβ", a menos que se indique lo contrario.

"Se une específicamente a HPTPβ-ECD" se refiere a la capacidad de un agente de unión específico de la presente invención para reconocer y unirse a un epítopo del dominio extracelular de HPTPβ con mayor afinidad que a otras moléculas relacionadas y / o no relacionadas. Los agentes de unión específicos se unen preferentemente a HPTPβ en una mezcla compleja de proteínas y / o macromoléculas. El agente de unión específico es preferiblemente selectivo para HPTPβ. "Selectivo" significa que el agente tiene una actividad significativamente mayor hacia HPTPβ en comparación con otras moléculas relacionadas y / o no relacionadas, y no que esté completamente inactivo con respecto a otras moléculas. Por ejemplo, un agente selectivo puede mostrar una selectividad de 10 veces, 100 veces o 1000 veces hacia HPTPβ respecto a otras moléculas relacionadas o no relacionadas.

La expresión "anticuerpos anti-HPTPβ-ECD" se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen al dominio extracelular de HPTPβ. Los anticuerpos anti-HPTPβ-ECD son un tipo de agente de unión a HPTPβ-ECD como se define en el presente documento.

El término "VE-PTP" se refiere al ortólogo de ratón de HPTPβ.

Todos los porcentajes, relaciones y proporciones en este documento están en peso, a menos que se especifique lo contrario. Todas las temperaturas están en grados Celsius (°C), a menos que se especifique lo contrario.

Los intervalos se pueden expresar en este documento como de un valor particular respecto a otro valor particular, los puntos finales se incluyen en el intervalo. Por ejemplo, para el intervalo de "1 mg a 50 mg" se incluyen los valores específicos de 1 mg y 50 mg. El antecedente "aproximadamente" indica que los valores son aproximados. Por ejemplo, para el intervalo de "aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg" indica que los valores son valores aproximados. Además, cuando se expresa dicho intervalo, el intervalo incluye el intervalo “de 1 mg a 50 mg”. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final, como independientemente del otro punto final. Por ejemplo, el intervalo “de 1 mg a 50 mg” incluye el intervalo “de 30 mg a 40 mg. ”

"Cantidad efectiva" significa una cantidad de un agente activo o combinación de agentes efectivos para mejorar o prevenir los síntomas, o prolongar la supervivencia del paciente que está siendo tratado. Una cantidad efectiva puede variar según los factores conocidos en la técnica, tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del ser humano o animal que se está tratando. Aunque se pueden describir regímenes de dosificación particulares en los ejemplos de la presente, cualquier persona experta en la técnica apreciaría que el régimen de

dosificación se puede alterar para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas pueden administrarse diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Además, las composiciones de esta descripción se pueden administrar con la frecuencia necesaria para lograr una cantidad terapéutica. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en este documento.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibir" o "inhibir" se refiere a una reducción de actividad estadísticamente significativa y medible, preferiblemente una reducción de al menos aproximadamente un 10% frente al control, más preferiblemente una reducción de aproximadamente un 50% o más, aún más preferiblemente un reducción de aproximadamente un 80% o más.

Como se usa en el presente documento, el término "aumento" o "incremento" se refiere a un aumento de actividad estadísticamente significativo y medible, preferiblemente un aumento de al menos aproximadamente un 10% frente al control, más preferiblemente un aumento de aproximadamente un 50% o más, aún más preferiblemente un aumento de aproximadamente un 80% o más.

"HPTP beta" o "HPTPβ" se usan indistintamente en el presente documento y son abreviaturas para la proteína humana tirosina fosfatasa beta.

Como se usa en este documento, "sujeto" significa un individuo. Por lo tanto, el "sujeto" puede incluir animales domésticos (p. ej., gatos, perros, etc.), ganado (p. ej., vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), animales de laboratorio (p. ej., ratón, conejo, rata, conejillo de indias, etc.) y aves. "Sujeto" también puede incluir un mamífero, como un primate o un ser humano. "Sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en este documento. Preferiblemente el sujeto es un ser humano.

Por "reducir" u otras expresiones, como "que reduce" o "reducción", se entiende la disminución de un evento o característica (por ejemplo, derrame vascular). Se entiende que suele estar relacionado con algún valor estándar o esperado, en otras palabras, es relativo, pero que no siempre es necesario hacer referencia al valor estándar o relativo.

Los términos "tratamiento", "que trata", "tratar" y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y / o fisiológico deseado, como mitigar una enfermedad o trastorno en un huésped y / o reducir, inhibir o eliminar una determinada característica o evento asociado con un trastorno (p. ej., un edema ocular). Por lo tanto, el término "tratamiento" incluye prevenir que aparezca un trastorno en un huésped, particularmente cuando el huésped está predispuesto a adquirir la enfermedad, pero aún no se le ha diagnosticado la enfermedad; inhibiendo el trastorno y / o aliviando o revertiendo el trastorno. En la medida en que los métodos de la presente invención están dirigidos a prevenir trastornos, se entiende que el término "prevenir" no requiere que el estado de la enfermedad sea completamente curado. Más bien, como se usa en el presente documento, el término prevención se refiere a la capacidad del experto en la técnica en identificar una población que sea susceptible a trastornos, de modo que la administración de los compuestos de la presente invención pueda ocurrir antes del inicio de la enfermedad. El término no implica que el estado de la enfermedad se evite por completo.

A menos que se especifique lo contrario, la retinopatía diabética incluye todas las etapas de la retinopatía no proliferativa y la retinopatía proliferativa.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, la palabra "comprender" y otras formas de la palabra, como "que comprende" y "comprende", significa, entre otras, y no pretende excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

Como se usa en la descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una/un” y “la/el” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una composición" incluye una composición o mezclas de dos o más de tales composiciones.

“Opcional” u “opcionalmente” significa que el evento o circunstancia que se describe posteriormente puede o no acontecer y que la descripción incluye casos en los que el evento o la circunstancia aparece y casos en los que no.

"Se une específicamente a HPTPβ" se refiere a la capacidad de un agente de la presente invención para reconocer y unirse a un epítopo del dominio extracelular de HPTPβ con mayor afinidad que a las otras moléculas relacionadas y / o no relacionadas. El agente es preferiblemente selectivo para HPTPβ. "Específico" significa que el agente tiene una actividad significativamente mayor hacia HPTPβ en comparación con otras moléculas relacionadas y / o no relacionadas, no es que esté completamente inactivo con respecto a otras moléculas. Por ejemplo, un agente selectivo puede mostrar una selectividad de 10 veces, 100 veces o 1000 veces hacia HPTPβ que a otra molécula relacionada o no relacionada.

El término "epítopo" se refiere a cualquier porción de cualquier molécula capaz de ser reconocida y unida por un agente en una o más de las regiones de unión al antígeno del agente. Los epítopos generalmente consisten en agrupaciones de superficie distintas y reconocibles, tales como aminoácidos, azúcares, lípidos, fosforilo o sulfonilo,

y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y / o características de carga específicas. Los epítopos, tal como se usan en el presente documento, pueden ser conformacionales o lineales.

"Pepticuerpo" es una molécula que comprende un dominio Fc de anticuerpo unido al menos a un péptido. La producción de pepticuerpos se describe generalmente en el documento WO2002 / 24782.

"Fragmento" se refiere a una porción de un agente. Un fragmento puede retener la actividad biológica deseada del agente y puede considerarse como un agente en sí mismo. Por ejemplo, una proteína truncada en la que se elimina el terminal amino y / o el terminal carboxi y / o un residuo de aminoácido interno es un fragmento de la proteína y un Fab de una molécula de inmunoglobulina es un fragmento de la inmunoglobulina. Dichos fragmentos también pueden conectarse a otra molécula por medio de una conexión directa (por ejemplo, un péptido o enlace disulfuro) o por medio de un enlazador.

"Proteína" se usa en este documento de manera intercambiable con péptido y polipéptido.

Los péptidos de la presente invención incluyen, entre otros, secuencias de aminoácidos que tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 75 aminoácidos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 aminoácidos. Los péptidos pueden ser secuencias de aminoácidos naturales o artificiales.

Se puede obtener una proteína de la invención por métodos reconocidos en la técnica, por ejemplo, usando técnicas estándar de síntesis directa de péptidos, tales como a través de una síntesis en fase sólida. Si la secuencia del gen es conocida o puede deducirse, entonces la proteína puede producirse mediante métodos recombinantes estándar. Las proteínas pueden aislarse o purificarse en una variedad de formas conocidas por los expertos en la materia. Los métodos de purificación estándar incluyen precipitación con sales, técnicas electroforéticas, cromatográficas y similares.

Los agentes pueden estar conjugados de forma covalente o no covalente a un vehículo. El término "vehículo" se refiere a una molécula que evita la degradación y / o aumenta la vida media, reduce la toxicidad, reduce la inmunogenicidad o aumenta la actividad biológica del agente. Los vehículos ejemplares incluyen, entre otros, dominios Fc de inmunoglobulinas y polímeros, por ejemplo: polietilenglicol (PEG), polilisina, dextrano, un lípido, un grupo colesterol (como un esteroide); un carbohidrato u oligosacárido; o cualquier proteína o péptido natural o sintético que se una a un receptor de rescate.

Los "derivados" incluyen aquellos agentes de unión que se han modificado químicamente de alguna manera distinta a partir de las variantes de inserción, deleción o sustitución. Por ejemplo, en el que el agente de unión es una proteína, el terminal carboxilo puede estar terminado con un grupo amino, tal como NH_2.

En algunas realizaciones, una o más moléculas están unidas para formar el agente. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden estar conectados por un enlazador. En general, la estructura química del enlazador no es crítica ya que sirve principalmente como un espacio. En un ejemplo, el enlazador está hecho de aminoácidos unidos entre sí por medio de enlaces peptídicos. En otro ejemplo, el enlazador es un enlazador no peptídico tal como un grupo alquilo C_1-C_6 que no obstaculiza estéricamente. En otra realización, el enlazador es un enlazador PEG. Se apreciará además que el enlazador se puede insertar en varios lugares de la molécula.

Las variantes de un agente están incluidas dentro del alcance de la presente invención. "Variante" o "Variantes", como se usa en el presente documento, significa un agente que tiene una secuencia de proteínas o nucleótidos que es sustancialmente similar a la secuencia de proteínas o nucleótidos del agente no variante y que comparte una actividad similar del agente no variante. Una secuencia de proteínas o nucleótidos puede alterarse de varias maneras para producir una variante abarcada por la presente invención, que incluye sustituciones, deleciones, truncamientos, inserciones y otras modificaciones. Los métodos para tales manipulaciones son reconocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (y actualizaciones) Ausubel et al., Eds (1996), John Wiley and Sons, New York: Methods in Molecular Biology, Vol. 182, In vitro Mutagenesis Protocols, 2ª edición, Barman Ed. (2002), Humana Press, y las referencias allí citadas. Por ejemplo, las variantes incluyen péptidos y polipéptidos en los que los residuos de aminoácidos se insertan, eliminan y / o sustituyen en la secuencia de aminoácidos conocida para el agente de unión. En un ejemplo, la sustitución del aminoácido es conservadora porque altera mínimamente las propiedades bioquímicas de la variante. En otras realizaciones, la variante puede ser un fragmento activo de una proteína de longitud completa, una proteína modificada químicamente, una proteína modificada mediante la adición de marcadores de epítopo o afinidad, o restos de marcado fluorescente u otros, ya sea por tratamientos enzimáticos in vivo o in vitro de la proteína, por modificación química, o por la síntesis de la proteína usando aminoácidos modificados.

También se contemplan en el presente documento proteínas de fusión. Usando métodos conocidos, los expertos en la materia podrían preparar proteínas de fusión de las proteínas de la descripción; que, si bien son diferentes de la forma nativa, pueden ser útiles. Por ejemplo, la pareja de fusión puede ser una secuencia de polipéptidos de señal (o líder) que dirija, de forma co-transduccional o post-transduccional, la transferencia de la proteína desde su sitio de síntesis a otro sitio (por ejemplo, el líder del factor alfa de levadura). Alternativamente, se puede agregar para

facilitar la purificación o identificación de la proteína de la descripción (por ejemplo, poli-His, péptido Flag o proteínas fluorescentes).

Se pueden usar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en este documento. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describe en las diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento son las conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica y los procedimientos y técnicas de laboratorio. Se pueden utilizar técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, administración y tratamiento de pacientes.

Listado de secuencias

Tabla 1

SEQ ID NO: 1	Secuencia de nucleótidos de HPTPβ humana de longitud completa (X54131)
SEQ ID NO: 2	Secuencia de aminoácidos de HPTPβ humana de longitud completa (P23467)
SEQ ID NO: 3	Porción extracelular de HPTPβ humano con marcador $(His)_6Gly$
SEQ ID NO: 4	Porción extracelular de HPTPβ humano
SEQ ID NO: 5	Secuencia completa de nucleótidos VE-PTP de ratón
SEQ ID NO: 6	Secuencia completa de aminoácidos VE-PTP de ratón
SEQ ID NO: 7	Porción extracelular de secuencia de aminoácidos VE-PTP de ratón

Agentes de unión a HPTPβ-ECD

Los agentes útiles en la presente descripción incluyen, entre otros, anticuerpos, proteínas, darpinas, péptidos, aptámeros, adnectinas, pepticuerpos o ácidos nucleicos que se unen específicamente a la porción extracelular de HPTPβ e inhiben al menos una actividad fosfatasa de HPTPβ. Como se usa en el presente documento, "actividad de fosfatasa" incluye actividad enzimática y actividad biológica donde la actividad biológica se mide evaluando la fosforilación de Tie2.

Los agentes útiles en la presente descripción incluyen además: anticuerpos, o sus fragmentos de unión al antígeno que se unen a la porción extracelular de HPTPβ, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe al menos una actividad de fosfatasa de HPTPβ. Estos agentes incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales. Un agente puede ser un fragmento de un anticuerpo, en el que el fragmento comprende las regiones variables de la cadena pesada y ligera, o el fragmento es un $F(ab')_2$, o el fragmento es un dímero o trímero de un Fab, Fv, scFv, o un día-, tria- o tetra-cuerpo derivado del anticuerpo.

Por ejemplo, el agente puede ser, sin limitación, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la porción extracelular de HPTPβ; o, en particular, un anticuerpo que se une a una repetición FN3 de HPTPβ o, más específicamente, un anticuerpo que se une a la primera repetición FN3 de HPTPβ.

Los agentes incluyen además: el anticuerpo monoclonal R15E6 que se describe en la patente de EE.UU. No. 7.973.142 o el miembro de familia WO2007/116360 A2, que se incorpora por la presente en su totalidad. (El hibridoma de ratón, las células de bazo Balbc (células B) que pueden usarse para producir el anticuerpo se depositan en la American Type Culture Collection (ATCC), PO Box 1549, Manassas, Virginia 20108 EE. UU. el 4 de mayo de 2006, denominado ATCC No. PTA-7580) (denominado en el presente documento R15E6)), anticuerpos que tienen las mismas, o sustancialmente las mismas, características biológicas de R15E6; fragmentos de anticuerpo de R15E6, donde el fragmento comprende las regiones variables de la cadena pesada y ligera; un $F(ab')_2$ de R15E6; dímeros o trímeros de un Fab, Fv, scFv; y dia-, tria- o tetra-cuerpos derivados de R15E6.

En particular, un agente adecuado para usar en la presente invención es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, variante o sus derivados, ya sea solo o en combinación con otras secuencias de aminoácidos, proporcionadas por técnicas conocidas. Dichas técnicas incluyen, entre otras, la escisión enzimática, escisión química, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes. La invención abarca además agentes derivados, p. ej. pepticuerpos.

Por lo tanto, una realización de un agente de unión a HPTPβ-ECD es el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ATCC No. PTA-7580. En otra realización más, el agente de unión a HPTPβ-ECD es un

fragmento de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ATCC No. PTA-7580. En otra realización más, el agente de unión a HPTPβ-ECD es un anticuerpo que tiene las mismas, o sustancialmente las mismas, características biológicas que el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ATCC No. PTA-7580 o su fragmento de unión a antígeno.

Cualquiera de las realizaciones o ejemplos de los agentes de unión a HPTPβ-ECD descritos en la presente solicitud pueden conjugarse covalentemente o no covalentemente a un vehículo. El término "vehículo" se refiere a una molécula que afecta a una propiedad biológica de un agente. Por ejemplo, el vehículo puede evitar la degradación y / o aumentar la vida media, la absorción, reducir la toxicidad, reducir la inmunogenicidad o aumentar la actividad biológica del agente. Los vehículos ejemplares incluyen, entre otros, dominios Fc de inmunoglobulinas; polímeros, por ejemplo: polietilenglicol (PEG), polilisina, dextrano; lípidos; grupos de colesterol (como un esteroide); carbohidratos, dendrímeros, oligosacáridos o péptidos que se unen a un receptor de rescate. En algunas realizaciones, el vehículo es polietilenglicol (PEG). En otras realizaciones, el vehículo es polilisina. En otras realizaciones más, el vehículo es dextrano. En otras realizaciones más, el vehículo es un lípido.

Uniones de polímeros solubles en agua, tales como polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol, como se describen en las patentes de EE.UU. Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; y 4.179.337, que se incorporan en este documento en su totalidad. Aún otros polímeros útiles conocidos en la técnica incluyen monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos, poli-(N-vinil pirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno / óxido de etileno, polioles polioxietilados (p. ej., glicerol) y alcohol polivinílico, así como mezclas de estos polímeros. Particularmente preferidos son los pepticuerpos modificados covalentemente con subunidades de polietilenglicol (PEG). Los polímeros solubles en agua pueden unirse en posiciones específicas, por ejemplo, en el extremo amino de los pepticuerpos, o unirse aleatoriamente a una o más cadenas laterales del polipéptido. El uso de PEG para mejorar la capacidad terapéutica de los agentes, p. ej. los pepticuerpos, y para anticuerpos humanizados en particular, se describen en la patente de EE.UU. Nº 6.133.426. La invención también contempla derivatizar la porción de péptido y / o vehículo de los agentes. Tales derivados pueden mejorar la solubilidad, absorción, vida media biológica y similares de los agentes. Los restos pueden eliminar o atenuar alternativamente cualquier efecto secundario indeseable de los agentes y similares.

El término "anticuerpo" (Ab), tal y como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo, anticuerpos de llama y camello, fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, regiones variables y / o fragmentos de región constante, siempre que exhiban una actividad biológica deseada, por ejemplo, actividad de unión a antígeno. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa indistintamente con "anticuerpo" en el presente documento.

Un "fragmento de unión a antígeno", tal y como se usa en el presente documento, es un fragmento de un agente que se une a una porción de HPTPβ e inhibe la actividad de HPTPβ.

Un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que ha sido identificado, y / o separado, y / o recuperado de su entorno natural.

La unidad básica de anticuerpos de cuatro cadenas es una glucoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consta de 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional llamado cadena J, y por lo tanto, contienen 10 sitios de unión al antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprendan 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de cuatro cadenas consiste generalmente en aproximadamente 150 kilo Daltons (kDa). Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas alfa y gamma y cuatro dominios C_H para los isotipos mu y épsilon. Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. El emparejamiento de un V_H con un V_L forma un único sitio de unión al antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton y Lange, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas como alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las clases gamma y alfa se

dividen además en subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H, por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Los miembros de la familia Camelidae, por ejemplo, llama, camello y dromedarios, contienen un tipo único de anticuerpo, que carecen de cadenas ligeras y carecen aún más del dominio C_{H1} (Muyldermans, S., Rev. Mol. Biotechnol., Vol. 74, pp. 277-302 (2001)). La región variable de estos anticuerpos de cadena pesada se denomina V_{HH} o VHH, y constituye el fragmento de unión a antígeno intacto más pequeño disponible (15 kDa) derivado de una inmunoglobulina funcional.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular con respecto a su antígeno. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en el intervalo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables llamados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad llamadas "regiones hipervariables" que tienen cada una de 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de hoja β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de hoja β. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La expresión "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la V_L, y alrededor de 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en la V_H; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y / o los residuos de un "bucle hipervariable".

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único epítopo, es decir, un único determinante antigénico. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin ser contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse mediante la metodología de hibridoma o pueden elaborarse usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas de animales o plantas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago, usando las técnicas disponibles, por ejemplo, Clackson et al., Nature, vol. 352, pp. 624-628 (1991).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y / o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (véase la patente de EE.UU. 4.816.567, y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, pp. 6851-6855 (1984)).

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo multimérico, preferiblemente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$, dímeros y trímeros de conjugados Fab, Fv, scFv, minicuerpos; dia-, tria- y tetracuerpos; anticuerpos lineales (Ver Hudson et al., Nature Med. Vol. 9, pp. 129-134 (2003)).

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

Un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesadas (V_H) y ligeras (V_L) de las inmunoglobulinas, conectadas con un péptido enlazador corto de diez a

aproximadamente 25 aminoácidos. El enlazador generalmente es rico en glicina para mejorar su flexibilidad, así como en serina o en treonina para mejorar su solubilidad, y puede conectar el extremo N de la V_H con el extremo C de la V_L, y viceversa. Esta proteína retiene la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del enlazador.

Los fragmentos variables divalentes (o bivalentes) de cadena sencilla (di-scFvs, bi-scFvs) se pueden diseñar uniendo dos scFvs. Esto se puede hacer produciendo una sola cadena peptídica con dos regiones V_H y dos regiones V_L, produciendo scFvs en tándem. Otra posibilidad es la creación de scFv con péptidos enlazadores que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen (aproximadamente cinco aminoácidos), lo que obliga a los scFv a dimerizarse. Este tipo se conoce como diacuerpos. Se ha demostrado que los diacuerpos tienen constantes de disociación hasta 40 veces más bajas que los scFv correspondientes, lo que significa que tienen una afinidad mucho mayor con su diana. En consecuencia, los medicamentos basados en diacuerpos podrían dosificarse a una concentración mucho más baja que otros anticuerpos terapéuticos y son capaces de atacar altamente específicamente los tumores in vivo. Los enlazadores aún más cortos (uno o dos aminoácidos) conducen a la formación de trímeros, llamados triacuerpos o tricuerpos. Los tetracuerpos son conocidos y se ha demostrado que exhiben una afinidad aún mayor por sus objetivos que los diacuerpos.

La expresión "anticuerpo humanizado" o "anticuerpo humano" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en las que al menos una porción de la secuencia V_H y / o V_L ha sido modificada para que sea más "humana", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en el que las secuencias de CDR humanas se introducen en secuencias de V_H y V_L no humanas para reemplazar las secuencias de CDR no humanas correspondientes. Los expertos en la técnica conocen los medios para fabricar anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 4.816.567 y 5.225.539). Un método para fabricar anticuerpos humanos emplea el uso de animales transgénicos, como ratones transgénicos. Estos animales transgénicos contienen una parte sustancial del genoma productor de anticuerpos humanos insertado en su propio genoma y la producción de anticuerpos endógenos propios del animal se vuelve deficiente en la producción de anticuerpos. Los métodos para fabricar tales animales transgénicos son conocidos en la técnica. Tales animales transgénicos se pueden preparar usando la tecnología XenoMouse® o usando un enfoque de "minilocus". Los métodos para hacer XenoMice® se describen en la patente de EE.UU. Nos. 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598 y 6.075.181. Los métodos para hacer animales transgénicos usando el enfoque de "minilocus" se describen en las patentes de EE.UU. Nos. 5.545.807, 5.545.806, 5.625.825 y WO 93/12227.

La humanización de un anticuerpo no humano se ha convertido en rutina en los últimos años, y en este momento pertenece al conocimiento común de cualquier experto en la materia. Varias compañías brindan servicios para fabricar anticuerpos humanizados, por ejemplo, Xoma, Aries, Medarex, PDL y Cambridge Antibody Technologies. Los protocolos de humanización se describen ampliamente en la bibliografía técnica, por ejemplo, Kipriyanov y Le Gall, Molecular Biotechnol, vol. 26, págs. 39-60 (2004), Humana Press, Totowa, N.J .; Lo, Methods Mol. Biol., Vol. 248, págs. 135-159 (2004), Humana Press, Totowa, N.J .; Wu y col., J. Mol. Biol. Vol. 294, pp. 151-162 (1999).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos útiles en la presente descripción pueden expresarse en líneas celulares distintas de las líneas celulares de hibridoma. Pueden usarse secuencias que codifican anticuerpos particulares para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada mediante métodos conocidos para introducir polinucleótidos en una célula huésped, que incluyen, por ejemplo, empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula huésped con el virus (o vector), o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica en las patentes de EE.UU. Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. El procedimiento de transformación utilizado puede depender del huésped a transformar. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de un polinucleótido o varios polinucleótido en liposomas, mezcla de ácidos nucleicos con lípidos cargados positivamente y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Se insertan en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligamiento estándar una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada, una región variable de cadena pesada, una región constante de cadena ligera o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo, o un fragmento del mismo en una combinación adecuada si se desea. La región constante de la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo se puede unir al extremo C de la región variable apropiada y se liga a un vector de expresión. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped de modo que pueda producirse la amplificación del gen y / o la expresión del gen). Para una revisión de los vectores de expresión, véase Methods Enzymol., Vol. 185, (Goeddel, ed.), 1990, Academic Press.

Identificación de agentes de unión específicos

Los agentes de unión a HPTPβ-ECD adecuados pueden identificarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los agentes candidatos pueden seleccionarse para la unión a HPTPβ, y seleccionarse según su actividad. En general, los agentes candidatos serán seleccionados primero para la unión y, aquellos que muestren una unión selectiva, serán seleccionados para determinar la capacidad de inhibir la desfosforilación mediada por HPTPβ de Tie2. Sin embargo, en algunos casos, los agentes candidatos pueden seleccionarse primero in vivo para determinar la actividad.

Determinación de la actividad de unión

La selección de un ensayo adecuado para su uso en la identificación de un agente de unión específico depende de la naturaleza del agente candidato a cribar. Cualquier experto en la materia podría elegir los ensayos apropiados para el agente candidato particular.

Por ejemplo, cuando los candidatos son anticuerpos o pepticuerpos, que comprenden una fracción Fc, el análisis FACS como se describe en el Ejemplo 3B permite seleccionar el agente candidato en función de su capacidad para unirse a las células, que expresan HPTPβ. La célula puede expresar de manera endógena HPTPβ o puede ser modificada genéticamente para expresar HPTPβ.

Para otros agentes candidatos tales como aptámeros, se conocen otras técnicas en la técnica. Por ejemplo, los aptámeros que se unen específicamente a HPTPβ pueden seleccionarse utilizando una técnica conocida como SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) que selecciona aptámeros específicos a través de rondas repetidas de selección in vitro.

Determinación de la actividad inhibidora por Transferencia Western

Como se ejemplifica en el Ejemplo 4, en un ensayo adecuado, se cultivan HUVEC en medios sin suero en presencia o ausencia de diversas concentraciones del agente candidato y se preparan los lisados de las células, se inmunoprecipitan con un anticuerpo Tie2, se resuelven mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfieren a una membrana de PVDF. Las proteínas inmunoprecipitadas unidas a la membrana se transfieren en serie con un anticuerpo antifosfotirosina para cuantificar la fosforilación de Tie2 seguido de un anticuerpo Tie2 para cuantificar el Tie2 total. La fosforilación de Tie2 se expresa como la relación de la señal anti-fosfotirosina sobre la señal de Tie2 total. Mayores niveles de la señal anti-fosfotirosina indican una mayor inhibición de HPTPβ por el agente candidato.

Los agentes candidatos que pueden seleccionarse incluyen, entre otros, bibliotecas de agentes conocidos, incluidos productos naturales, como extractos de plantas o animales, moléculas biológicamente activas que incluyen proteínas, péptidos que incluyen entre otros miembros de bibliotecas de péptidos aleatorios y biblioteca molecular derivada de química combinatoria hecha de aminoácidos de configuración D o L, anticuerpos que incluyen, entre otros, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, humanos, de cadena única, fragmentos de la biblioteca de expresión de Fab, $F(ab)_2$ y Fab y sus fragmentos de unión a epítopos.

Como se usa en el presente documento, los "fragmentos de anticuerpos" incluyen, entre otros, un $F(ab')_2$, un dímero o trímero de un Fab, Fv, scFv o un dia-, tria- o tetra-cuerpo derivado de un anticuerpo.

Métodos

Se describen métodos para el tratamiento de enfermedades o afecciones oculares, especialmente retinopatías, edema ocular y neovascularización ocular. Los ejemplos no limitantes de estas enfermedades o afecciones incluyen edema macular diabético, degeneración macular relacionada con la edad (forma húmeda), neovascularización coroidea, retinopatía diabética, isquemia ocular, uveítis, oclusión venosa retiniana (central o ramificada), trauma ocular, edema inducido por cirugía, neovascularización inducida por cirugía, edema macular cistoide, isquemia ocular, uveítis, etc. Estas enfermedades o afecciones se caracterizan por cambios en la vasculatura ocular ya sea progresiva o no progresiva, y ya sea como resultado de una enfermedad o afección aguda, o como una enfermedad o afección crónica.

Un aspecto de los métodos descritos se refiere a enfermedades que son consecuencia directa o indirecta de la diabetes, entre otras, edema macular diabético y retinopatía diabética. La vasculatura ocular del diabético se vuelve inestable con el tiempo y conduce a afecciones como la retinopatía no proliferativa, el edema macular y la retinopatía proliferativa. A medida que el líquido se filtra hacia el centro de la mácula, la parte del ojo donde se produce una visión nítida y clara, la acumulación de líquido y la proteína asociada comienzan a depositarse sobre la mácula o debajo de ésta. Esto da como resultado una inflamación que perturba la visión central del sujeto. Esta condición se conoce como "edema macular. Otra condición que puede ocurrir es la retinopatía no proliferativa en la cual los cambios vasculares, como los microaneurismas, pueden aparecer fuera de la región macular del ojo.

Estas condiciones pueden o no progresar a retinopatía proliferativa diabética que se caracteriza por la neovascularización. Estos nuevos vasos sanguíneos son frágiles y susceptibles de sangrar. El resultado es la cicatrización de la retina, así como la oclusión o el bloqueo total de la vía de luz a través del ojo debido a la formación excesiva de nuevos vasos sanguíneos. Típicamente, los sujetos que tienen un edema macular diabético

padecen una etapa no proliferativa en la retinopatía diabética; sin embargo, no es raro que los sujetos solo comiencen a manifestar el edema macular al comienzo de la etapa proliferativa.

La retinopatía diabética, si no se trata, puede conducir a la ceguera. De hecho, la retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en las poblaciones en edad laboral.

Por lo tanto, los métodos descritos se refieren a la prevención, tratamiento, control, disminución y / o minimización de la neovascularización ocular en un sujeto con diabetes o un sujeto diagnosticado con diabetes. Además, los sujetos que tienen diabetes o los sujetos diagnosticados con diabetes pueden ser alertados o informados sobre los riesgos de desarrollar ceguera relacionada con la diabetes, por lo tanto, los métodos actuales pueden usarse para prevenir o retrasar la aparición de retinopatía no proliferativa en sujetos que se sabe que están en riesgo. Del mismo modo, pueden usarse métodos actuales para tratar a sujetos que tienen o están siendo diagnosticados con retinopatía diabética no proliferativa para prevenir la progresión de la afección.

Los métodos descritos se refieren a prevenir o controlar la neovascularización ocular o tratar una enfermedad o afección que está relacionada con el inicio de la neovascularización ocular mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un aspecto de este método se refiere al tratamiento o a la prevención de la neovascularización ocular mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un ejemplo de este aspecto se refiere a un método para tratar la neovascularización ocular que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles.

Por lo tanto, un ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir la neovascularización ocular en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otro ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir la neovascularización ocular en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles. Otra realización más de la presente descripción es el uso de un agente de unión a HPTPβ-ECD en el tratamiento de la neovascularización ocular.

Los métodos descritos también se refieren a la prevención o el control del edema ocular o el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con la aparición del edema ocular mediante la administración a un sujeto de un agente de unión a HPTPβ-ECD.

Un aspecto de este método se refiere al tratamiento o la prevención del edema ocular mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un ejemplo de este aspecto se refiere a un método para tratar el edema ocular que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende:

a. una cantidad efectiva de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

b. uno o más vehículos o excipientes compatibles.

Por lo tanto, una realización de la presente descripción es un método para tratar o prevenir el edema ocular en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otro ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir el edema ocular en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende el agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles. Un ejemplo de la presente descripción es el uso de un agente de unión a HPTPβ-ECD en el tratamiento del edema ocular.

Otro método descrito se refiere a prevenir o controlar el edema retiniano o la neovascularización retiniana, o tratar una enfermedad o afección relacionada con el inicio del edema retiniano o la neovascularización retiniana, mediante la administración a un sujeto de un agente de unión a HPTPβ-ECD. Un aspecto de este método se refiere al tratamiento o la prevención del edema retiniano o la neovascularización retiniana mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un ejemplo de este aspecto se refiere a un método para tratar el edema retiniano o la neovascularización retiniana que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende una cantidad efectiva de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles.

Por lo tanto, un ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir el edema retiniano en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otro ejemplo es un método para tratar o prevenir la neovascularización

retiniana que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir el edema retiniano en un sujeto, administrando una composición que comprende una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles. Otra realización es un método para tratar o prevenir la neovascularización de la retina mediante la administración de una cantidad efectiva de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles. Otro ejemplo es el uso de un agente de unión a HPTPβ-ECD en el tratamiento del edema retiniano. Otro ejemplo adicional es el uso de un agente de unión a HPTPβ-ECD en el tratamiento de la neovascularización retiniana.

Otro método descrito se refiere al tratamiento, la prevención o el control de la retinopatía diabética, o al tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con el inicio de la retinopatía diabética mediante la administración a un sujeto de un agente de unión a HPTPβ-ECD.

Un aspecto de este método se refiere al tratamiento o a la prevención de la retinopatía diabética mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un ejemplo de este aspecto se refiere a un método para tratar la retinopatía diabética que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles.

Por lo tanto, un ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir la retinopatía diabética en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otro ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir la retinopatía diabética en un sujeto administrando una composición que comprende una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles. Otra realización más de la presente descripción es el uso de un agente de unión a HPTPβ-ECD en el tratamiento de la retinopatía diabética.

Un método más descrito se refiere a un método para tratar o prevenir la retinopatía no proliferativa que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra descripción de este aspecto se refiere a un método para tratar o prevenir la retinopatía no proliferativa que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y uno o más vehículos o excipientes compatibles.

Por lo tanto, un ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir la retinopatía no proliferativa en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otro ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir la retinopatía no proliferativa en un sujeto, administrando una composición que comprende una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles. Otro ejemplo más de la presente descripción es el uso de un agente de unión a HPTPβ-ECD en el tratamiento de la retinopatía no proliferativa.

Otro método más descrito se refiere a prevenir o controlar el edema macular diabético, o tratar una enfermedad o afección que esté relacionada con la aparición del edema macular diabético mediante la administración a un sujeto de un agente de unión a HPTPβ-ECD.

Un aspecto de este método se refiere al tratamiento o la prevención del edema macular diabético mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un ejemplo de este aspecto se refiere a un método para tratar el edema macular diabético que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende: a) una cantidad eficaz de uno o más de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y b) uno o más vehículos o excipientes compatibles.

Por lo tanto, un ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir el edema macular diabético en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otro ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir el edema macular diabético en un sujeto administrando una composición que comprende una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles. Otro ejemplo más de la presente descripción es el uso de un agente de unión a HPTPβ-ECD en el tratamiento del edema macular diabético.

Otro ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir el edema de degeneración macular en forma húmeda relacionado con la edad en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otro ejemplo de la presente descripción es un método para tratar o prevenir el edema de degeneración macular en forma húmeda relacionado con la edad en

un sujeto administrando una composición que comprende una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles. Otro ejemplo más de la presente descripción es el uso de un agente de unión a HPTPβ-ECD en el tratamiento del edema de degeneración macular en forma húmeda relacionado con la edad.

Otro ejemplo es un método para tratar, prevenir o controlar la neovascularización coroidea y la neovascularización inducida por cirugía administrando a un sujeto una cantidad efectiva de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otro ejemplo es un método para tratar, prevenir o controlar la neovascularización coroidea y la neovascularización inducida por cirugía administrando al sujeto una composición que comprenda una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos o excipientes compatibles. Otro ejemplo más de la presente descripción es el uso de un agente de unión a HPTPβ-ECD en el tratamiento de la neovascularización coroidea y la neovascularización inducida por cirugía.

Otro ejemplo es una composición para tratar o prevenir un trastorno ocular que comprende un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Otro ejemplo más es una composición para tratar o prevenir un trastorno ocular que comprende un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una o más composiciones portadoras farmacéuticamente aceptables en las que el trastorno ocular es la neovascularización ocular, la neovascularización retiniana, la degeneración macular relacionada con la edad y la neovascularización inducida por cirugía.

En algunos ejemplos, el agente de unión a HPTPβ-ECD o su sal farmacéuticamente aceptable se usa para tratar un trastorno ocular. En algunos ejemplos, el agente de unión a HPTPβ-ECD o su sal farmacéuticamente aceptable se usa para tratar un trastorno ocular, en el que el trastorno ocular es la neovascularización ocular, neovascularización retiniana, la degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización coroidea y la neovascularización inducida por cirugía.

En otros ejemplos más, el agente de unión a HPTPβ-ECD o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se usa para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno ocular. En algunas realizaciones, el trastorno ocular es la neovascularización ocular, neovascularización retiniana, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización coroidea y la neovascularización inducida por cirugía.

Dosificación

Las dosis efectivas y los programas para administrar el agente de unión a HPTPβ-ECD pueden determinarse empíricamente, y hacer que tales determinaciones estén dentro de la competencia de la técnica. Los expertos en la materia entenderán que la dosis del agente que debe administrarse variará dependiendo, por ejemplo, del sujeto que recibirá el agente, la vía de administración, el tipo particular de agente utilizado y otros medicamentos que se administren al sujeto. Por ejemplo, se encuentra orientación en la selección de dosis apropiadas para anticuerpos en la bibliografía sobre usos terapéuticos de anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., Eds., Noges Publications, Park Ridge, N.J., (1985) cap. 22 y pp. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., Eds., Raven Press, Nueva York (1977) pp. 365-389. Una dosis típica del agente usado solo puede variar de aproximadamente 0,01 mg / kg hasta 500 mg / kg de peso corporal o más por día, o de aproximadamente 0,01 mg / kg a aproximadamente 50 mg / kg, o de 0,1 mg / kg a aproximadamente 50 mg / kg, o de aproximadamente 0,1 mg / kg hasta aproximadamente 10 mg / kg, o de aproximadamente 0,2 mg / kg a aproximadamente 1 mg / kg, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

Un ejemplo se refiere a un método para tratar la neovascularización ocular que comprende administrar a un sujeto de aproximadamente 0,01 mg / kg a aproximadamente 50 mg / kg de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otra iteración de este ejemplo se refiere a la administración a un sujeto de aproximadamente 0,1 mg / kg a aproximadamente 10 mg / kg en peso del sujeto a tratar, un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una iteración más de este ejemplo se refiere a un método para tratar o prevenir enfermedades o afecciones relacionadas con la neovascularización ocular que comprende administrar a un sujeto de aproximadamente 1 mg / kg a aproximadamente 10 mg / kg en peso del sujeto un agente de unión a HPTPβ-ECD o su sal farmacéuticamente aceptable. Todavía otra iteración de este ejemplo se refiere a un método para tratar o prevenir enfermedades o afecciones relacionadas con la neovascularización ocular que comprende administrar a un sujeto de aproximadamente 5 mg / kg a aproximadamente 10 mg / kg en peso del sujeto un agente de unión de HPTPβ-ECD o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una iteración más de este ejemplo se refiere a un método para tratar o prevenir enfermedades o afecciones relacionadas con la neovascularización ocular que comprende administrar a un sujeto de aproximadamente 1 mg / kg a aproximadamente 5 mg / kg en peso del sujeto un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otra iteración más de este ejemplo se refiere a un método para tratar o prevenir enfermedades o afecciones relacionadas con la neovascularización ocular que comprende administrar a un sujeto de aproximadamente 3 mg / kg a aproximadamente 7 mg / kg en peso del sujeto un agente de unión a HPTPβ-ECD o su sal farmacéuticamente aceptable.

Los programas de dosificación para la administración de un agente de unión a HPTPβ-ECD incluyen, entre otros, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, tres veces, dos veces al mes, una vez al mes y una vez cada dos meses.

Además se describen métodos para tratar o prevenir una o más de las enfermedades o afecciones descritas anteriormente en este documento relacionadas con el edema ocular y / o la neovascularización que son el resultado de la administración de otro agente farmacéuticamente activo. Como tal, este aspecto se refiere a un método que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende: a) una cantidad eficaz de un agente de unión a HPTPβ-ECD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; b) uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales; y c) uno o más vehículos o excipientes compatibles.

Los métodos de la presente invención pueden combinarse con un estándar de cuidados, que incluye, entre otros, un tratamiento láser.

Los ejemplos no limitantes de agentes farmacéuticamente activos adecuados para la combinación con un agente de unión a HPTPβ-ECD incluyen agentes antiinfecciosos, es decir, aminoglucósidos, antivirales, antimicrobianos, anticolinérgicos / antiespasmóticos, agentes antidiabéticos, agentes antihipertensivos, antineoplásicos, agentes cardiovasculares, agentes del sistema nervioso central, modificadores de la coagulación, hormonas, agentes inmunológicos, agentes inmunosupresores, preparaciones oftálmicas y similares.

El método descrito también se refiere a la administración de los agentes y composiciones descritos. La administración puede ser sistémica por vía subcutánea o administración i.v.; o el inhibidor de HPTP-β se administrará directamente al ojo, por ejemplo, local. Los métodos locales de administración incluyen, por ejemplo, gotas para los ojos, inyecciones o implantes subconjuntivales, inyecciones o implantes intravítreos, inyecciones o implantes sub-Tenon, incorporación en soluciones de irrigación quirúrgica, etc.

Los métodos descritos se refieren a la administración de un agente de unión a HPTPβ-ECD como parte de una composición farmacéutica. Las composiciones adecuadas para la administración local son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Publ. 2005/0059639). En diversos ejemplos, las composiciones de la invención pueden comprender un líquido que comprenda un agente activo en solución, en suspensión, o ambos. Como se usa en este documento, las composiciones líquidas incluyen geles. En un ejemplo, la composición líquida es acuosa. Alternativamente, la composición puede tomar la forma de una pomada. En otro ejemplo, la composición es una composición acuosa gelificable in situ. Dicha composición puede comprender un agente gelificante en una concentración eficaz para promover la gelificación en contacto con el ojo o fluido lagrimal en el exterior del ojo. Las composiciones acuosas de la invención tienen pH y osmolalidad compatibles oftálmicamente. La composición puede comprender una formulación de depósito oftálmico que comprende un agente activo para la administración subconjuntival. Las micropartículas que comprenden el agente activo pueden incrustarse en un polímero biocompatible farmacéuticamente aceptable o un agente de encapsulación de lípidos. Las formulaciones de depósito pueden adaptarse para liberar todo o sustancialmente todo el material activo durante un período prolongado de tiempo. La matriz polimérica o lipídica, si está presente, puede adaptarse para degradarse lo suficiente como para ser transportada desde el sitio de administración después de la liberación de todo o sustancialmente todo el agente activo. La formulación de depósito puede ser una formulación líquida que comprenda un polímero farmacéuticamente aceptable y un agente activo disuelto o disperso. Tras la inyección, el polímero forma un depósito en el sitio de las inyecciones, por ejemplo, gelificando o precipitando. La composición puede comprender un artículo sólido que puede insertarse en una ubicación adecuada en el ojo, tal como entre el ojo y el párpado o en el saco conjuntival, donde el artículo libere el agente activo. Los artículos sólidos adecuados para la implantación en el ojo de tal manera generalmente comprenden polímeros y pueden ser bioerosionables o no bioerosionables.

En un ejemplo de los métodos descritos, un sujeto humano con al menos un ojo con discapacidad visual se trata con 2-4000 µg de un agente de unión a HPTPβ-ECD mediante inyección intravítrea. La mejora de los síntomas clínicos se controla mediante uno o más métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, oftalmoscopia indirecta, fotografía de fondo de ojo, angiopatía por fluoresceína, electrorretinografía, examen del ojo externo, biomicroscopia con lámpara de hendidura, tonometría de aplanamiento, paquimetría, tomografía de coherencia óptica y autorrefunción. Las dosis posteriores se pueden administrar semanal o mensualmente, por ejemplo, con una frecuencia de 2 a 8 semanas o de 1 a 12 meses de diferencia.

Los métodos descritos incluyen la administración de los agentes divulgados en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" significa un material que no es biológico o de otra manera indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la formulación farmacéutica en la que está contenido. El portador se seleccionaría naturalmente para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como es bien sabido por cualquier experto en la materia. En otro aspecto, muchos de los agentes descritos pueden usarse profilácticamente, es decir, como un agente preventivo, puro o con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones líquidas iónicas descritas en el presente documento pueden formularse convenientemente en composiciones farmacéuticas compuestas de líquido iónico puro o en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ver Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Gennaro, AR. Ed., Mack Publishing, Easton Pa.

(1990), que describe vehículos típicos y métodos convencionales de preparación de composiciones farmacéuticas que pueden usarse junto con la preparación de formulaciones de los agentes descritos en este documento y que se incorpora por referencia en este documento. Tales portadores farmacéuticos, más típicamente, serían portadores estándar para la administración de composiciones a humanos y no humanos, incluyendo soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Se pueden administrar otros agentes de acuerdo con los procedimientos estándar utilizados por los expertos en la materia. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos adicionales tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos y similares.

Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen los agentes descritos, matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas, micropartículas o microcápsulas. Será evidente para los expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la ruta de administración y la concentración de la composición que se administre. Se pueden administrar otros agentes de acuerdo con los procedimientos estándar utilizados por los expertos en la materia.

Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir vehículos adicionales, así como espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares, además de los agentes descritos en este documento. Las formulaciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos adicionales tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos y similares.

Para los fines de la presente divulgación, los términos "excipiente" y "vehículo" se usan indistintamente a lo largo de la descripción de la presente divulgación y dichos términos se definen en el presente documento como "ingredientes que se usan en la práctica de formular una composición farmacéutica segura y efectiva".

El formulador comprenderá que los excipientes se usan principalmente para servir en la entrega de un producto farmacéutico seguro, estable y funcional, que sirva no solo como parte del vehículo general para la entrega sino también como un medio para lograr una absorción efectiva por parte del receptor del ingrediente activo. Un excipiente puede desempeñar un papel tan simple y directo como ser un relleno inerte, o un excipiente como se usa en el presente documento puede ser parte de un sistema estabilizador del pH. El formulador también puede aprovechar el hecho de que los agentes de la presente invención tengan una potencia celular mejorada y propiedades farmacocinéticas.

Los agentes descritos también pueden estar presentes en líquidos, emulsiones o suspensiones para el suministro de agentes terapéuticos activos. Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables pueden, por ejemplo, prepararse disolviendo, dispersando, etc., un agente activo como se describe en este documento y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un excipiente, tal como, por ejemplo, agua, dextrosa acuosa salina, glicerol, etanol y otros, para formar una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que se administrará también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina de sodio, oleato de trietanolamina, etc. Los métodos reales de preparación de tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica, por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormente.

Kits

También se describen kits que comprenden los agentes y las composiciones que se administrarán a un humano, mamífero o célula. Los kits pueden comprender una o más dosis unitarias envasadas de una composición que comprenda uno o más agentes para ser entregados a un ser humano, mamífero o célula. Las ampollas de dosificación unitaria o los envases multidosis, en los que los agentes que se van a suministrar se envasan antes de su uso, pueden comprender un envase herméticamente cerrado que encierra una dosis unitaria de la composición, o dosis unitarias múltiples. Los agentes se pueden empaquetar como una formulación estéril, y el recipiente herméticamente sellado está diseñado para preservar la esterilidad de la formulación hasta su uso.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Producción de proteína de dominio extracelular HPTPβ

El ADNc de HPTPβ de longitud completa (SEQ ID NO: 1) se clona de una biblioteca placentaria humana de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Origene). Un ADNc que codifica todo el dominio extracelular soluble (ECD) de HPTPβ se clona por PCR a partir del ADNc de longitud completa que codifica los aminoácidos 1-1621 con un C-terminal His-His-His-His-His-His-Gly (6His-Gly) (SEQ ID N.º: 3). El ADNc resultante se clona en vectores de expresión de mamíferos para la expresión transitoria (pShuttle-CMV) o estable (pcDNA3.1 (-)) en células HEK293.

Para obtener HPTPβ ECD purificada (βED), las células HEK293 transfectadas con un vector de expresión de βECD se incuban en suero sin OptiMEM (Gibco) durante 24 horas en condiciones normales de crecimiento. Los medios acondicionados se recuperan, se centrifugan para eliminar los desechos, y se agrega 1 ml de agarosa Ni-NTA lavada (Qiagen) (500 µL de material empaquetado) a cada 10 µL de medio retirado y se deja agitar suavemente durante la noche a 4ºC. Al día siguiente, la mezcla se carga en una columna y se lava con 20 volúmenes de lecho de NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8. La proteína de dominio extracelular HPTPβ purificada (SEQ ID NO: 4) luego se eluye con 200 µL / elución en NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM, pH 8. Las fracciones se analizan para determinar el contenido de proteína usando electroforesis en gel de SDS-poliacrilimida de desnaturalización reductora y se detectan mediante tinción con plata (Invitrogen) y se confirman por espectrometría de masas.

Ejemplo 2

Generación de anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de HPTPβ

La proteína de dominio extracelular HPTPβ purificada se produce, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Para la producción del inmunógeno de dominio extracelular HPTPβ, la proteína de dominio 6-His extracelular HPTPβ purificada se conjuga con tiroglobulina porcina (Sigma) usando química de acoplamiento EDC (Hockfield, S. et al., (1993) Cold Spring Habor Laboratory Press. Vol. 1 pp. 111-201, Immunocytochemistry). El conjugado resultante de dominio extracelular HPTPβ-tiroglobulina se dializa contra PBS, pH 7,4. Los ratones adultos Balb / c se inmunizan luego por vía subcutánea con el conjugado (100-200 µg) y se completa el adyuvante de Freund en una mezcla 1:1. Después de 2-3 semanas, a los ratones se les inyecta intraperitonealmente o subcutáneamente con adyuvante de Freund incompleto y el conjugado en una mezcla 1:1. La inyección se repite a las 4-6 semanas. Se recolectan sueros de ratones 7 días después de la tercera inyección y se analiza su inmunorreactividad frente al antígeno de dominio extracelular HPTPβ mediante ELISA y transferencia Western. Los ratones que muestran una buena respuesta al antígeno se estimulan con una única inyección intra-bazo con 50 µl de proteína de dominio extracelular HPTPβ purificada mezclada 1:1 con hidróxido de aluminio usando una aguja extra larga de calibre 31 (Goding, JW, (1996) Monoclonal Antibodies: Principles and Practices. Third Edition, Academic Press Limited. pág. 145). Brevemente, los ratones se anestesian con 2,5% de avertina, y se crea una incisión de 1 centímetro en la piel y la pared oblicua izquierda del cuerpo. La mezcla de antígeno se administra insertando la aguja desde la porción posterior a la porción anterior del bazo en una inyección longitudinal. La pared del cuerpo se sutura y la piel se sella con dos pequeños clips metálicos. Los ratones son monitoreados para una recuperación segura. Cuatro días después de la cirugía, se extrae el bazo del ratón y se preparan suspensiones de células individuales para fusión con células de mieloma de ratón para la creación de líneas celulares de hibridoma (Spitz, M., (1986) Methods In Enzymology, vol. 121. Eds. John J, Lagone y Helen Van Vunakis. páginas. 33-41 (Academic Press, Nueva York, N.Y.)). Los hibridomas resultantes se cultivan en medio modificado de Dulbecco (Gibco) suplementado con suero de ternera fetal al 15% (Hyclone) e hipoxatina, aminopterina y timidina.

La detección de hibridomas positivos comienza 8 días después de la fusión y continúa durante 15 días. Los hibridomas que producen anticuerpos del dominio extracelular anti-HPTPβ se identifican por ELISA en dos conjuntos de placas de 96 pocillos: una recubierta con el dominio extracelular HPTPβ marcada con histidina y otra recubierta con una proteína MurA bacteriana marcada con histidina como control negativo. El anticuerpo secundario es un IgG anti-ratón de burro marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Immunoresearch). La inmunorreactividad se controla en los pocillos utilizando el desarrollo del color iniciado por tabletas ABTS disueltas en tampón TBS, pH 7,5. Las mezclas de reacción de HRP individuales se terminan agregando 100 microlitros de SDS al 1% y leyendo la absorbancia a 405 nm con un espectrofotómetro. Los hibridomas que producen anticuerpos que interactúan con el dominio extracelular HPTPβ-6His, y no con la proteína murA-6His, se usan para posteriores análisis. Las diluciones limitantes (0,8 células por pocillo) se realizan dos veces en clones positivos en placas de 96 pocillos, con la clonalidad definida con más del 99% de los pocillos con reactividad positiva. Los isotipos de anticuerpos se determinan utilizando la tecnología iso-strip (Roche). Para obtener anticuerpos purificados para una evaluación posterior, los sobrenadantes de cultivo de tejidos se purifican por afinidad usando una columna de proteína A o proteína G.

Se aislaron cinco anticuerpos monoclonales inmunorreactivos respecto a la proteína HPTPβ-ECD y se les dio la siguiente nomenclatura, R15E6, R12A7, R3A2, R11C3, R15G2 y R5A8. Sobre la base de su reacción con la proteína HPTPβ-ECD en ELISA y en transferencias Western, se seleccionó R15E6 para otros estudios.

Ejemplo 3

El anticuerpo monoclonal R15E6

El anticuerpo monoclonal R15E6 se identificó y caracterizó como se describe en el Ejemplo 2 de la presente solicitud y en la patente de EE.UU. No. 7.973.142; el procedimiento y los resultados se resumen a continuación.

A. R15E6 se une a HPTPβ endógeno como lo demuestra la inmunoprecipitación.

Materiales: células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), medios EGM y solución neutralizadora de tripsina de Cambrex; OPTIMEM I (Gibco), albúmina de suero bovino (BSA; Santa Cruz), solución salina tamponada

con fosfato (PBS; Gibco), factores de crecimiento que incluyen angiopoyetina 1 (Ang1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (R&D Systems), anticuerpo monoclonal Tie2 (Duke University / P & GP), anticuerpo policlonal del receptor VEGF 2 (VEGFR2) (Whitaker et. al), proteína A / G agarosa (Santa Cruz), sistema de electroforesis / transferencia de gel prefabricado con Tris-Glicina (6-8%) (Invitrogen), membranas de PVDF (Invitrogen), tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, glicerol al 10%, tritón-X-100 al 1%, EDTA 2 mM, NaOH 1 mM, NaF 1 mM, PMSF 1 mM, 1 µg / ml de leupeptina, 1 µg / ml de pepstatina).

Método: Se pretrataron HUVEC durante 30 minutos con anticuerpo (en OPTIMEM) u OPTIMEM I solo. Después de la eliminación del pretratamiento, las células se trataron con Ang1 (100 ng / ml) durante 6 minutos en PBS + BSA al 0,2% y se lisaron en tampón de lisis. Los lisados se procesaron directamente en un gel de Tris-Glicina o se inmunoprecipitaron con 2-5 µg / ml de anticuerpo Tie-2 o 10 µg / ml de anticuerpo R15E6 y proteína A / G agarosa. Las muestras inmunoprecipitadas se enjuagaron una vez con tampón de lisis y se hirvieron durante 5 minutos en 1 x tampón de muestra. Las muestras se resolvieron en un gel de Tris-Glicina, se transfirieron a una membrana de PVDF y se detectaron mediante transferencia Western usando los anticuerpos indicados (pTYR Ab (PY99, Santa Cruz), Tie-2, VEGFR2 y / o R15E6).

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

B. R15E6 se une a HPTPβ endógeno como lo demuestra el análisis FACS

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

Método: Los HUVEC se tratan con tripsina, se tratan con solución neutralizante de tripsina y se enjuagan con HBSS. El anticuerpo R15E6 (0,6 µg) se agrega a 250.000 células en 50 µl de HBSS y se incuba en hielo durante 20 minutos. Las células se enjuagaron con 1 ml de HBSS seguido de la adición de 2 µg de anticuerpo secundario conjugado fluorescente durante 20 minutos en hielo. Las células fueron enjuagadas y resuspendidas en 1 ml de HBSS y luego analizadas en el citómetro de flujo FACSCAN con el software CellQuest. Las células de control se trataron solo con anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia.

Resultados: Mediante análisis FACS, HUVEC intactos, R15E6 provoca un fuerte cambio (> 90% de las células) en la señal de fluorescencia en comparación con el anticuerpo secundario solo (Figura 1, Panel B). Este resultado indica que R15E6 se une a HPTPβ endógeno presentado en la superficie de las células endoteliales intactas.

Ejemplo 4

R15E6 mejora la activación de Tie2

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

Métodos: Los HUVEC se cultivan en medio sin suero como se describió anteriormente en presencia o ausencia de diversas concentraciones de R15E6 y con o sin Ang1 añadido. Los lisados se preparan, se inmunoprecipitan con un anticuerpo Tie2, se resuelven mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfieren a una membrana de PVDF. Las proteínas inmunoprecipitadas unidas a la membrana se transfieren en serie con un anticuerpo antifosfotirosina para cuantificar la fosforilación de Tie2 seguido de un anticuerpo Tie2 para cuantificar Tie2 total. La fosforilación de Tie2 se expresa como la relación de la señal de antifosfotirosina respecto a la señal de Tie2 total.

Resultados: R15E6 mejora la fosforilación de Tie2 tanto en ausencia como en presencia de Ang1 (figura 2). Este resultado indica que la unión de R15E6 a HPTPβ en la superficie de las células endoteliales modula su función biológica dando como resultado una mejor activación de Tie2 en ausencia o presencia de ligando.

Ejemplo 5

Generación de anticuerpos de dominio extracelular anti-VE-PTP

A. Producción de proteína de dominio extracelular VE-PTP de ratón (VE-PTP-ECD)

VE-PTP-ECD puede ser producido por cualquier método adecuado. Tales métodos son reconocidos en la técnica. Por ejemplo, VE-PTP-ECD puede producirse usando un método similar al Ejemplo 1 de la presente descripción donde se usa ADNc de VE-PTP-ECD en lugar de ADNc que codifica HPTPβ-ECD. La SEQ ID NO: 7 proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica VE-PTP-ECD. La SEQ ID NO: 8 proporciona la secuencia de aminoácidos de VE-PTP-ECD.

B. Generación de anticuerpos contra VE-PTP ECD

Los anticuerpos anti-VE-PTP se generan fácilmente mediante métodos que son reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos anti VE-PTP pueden generarse usando el método del Ejemplo 2 de la presente descripción sustituyendo VE-PTP-ECD por el dominio extracelular HPTPβ e inmunizando ratas con la proteína resultante. El Dr. D. Vestweber (mAb 109) proporcionó amablemente el anticuerpo VE-PTP antirratón de rata utilizado en los presentes estudios. El anticuerpo se generó como se describe en Baumer S. et al., Blood, 2006; 107: 4754-4762. Brevemente, el anticuerpo se generó inmunizando ratas con una proteína de fusión VE-PTP-Fc. La inmunización, la fusión de hibridoma y el cribado se realizaron como se describe en Gotsch U., et al., J Cell Sci. 1997, Vol. 110, pp. 583-588 y Bosse R. y Vestweber D., Eur J. Immunol. 1994, Vol. 24, pp. 3019-3024.

La proteína de fusión se construyó de manera que las primeras 8 repeticiones de tipo III de fibronectina que terminaban con el aminoácido prolina en la posición 732 de VE-PTP se fusionaron en marco con la parte Fc de IgG1 humana (comenzando con el aminoácido prolina en la posición 239). Esta construcción clonada en pcDNA3 (Invitrogen) se transfectó de forma estable en células CHO, y la proteína de fusión se purificó mediante purificación por afinidad de proteína A Sepharose.

Ejemplo 6

Inyecciones intravítreas de un anticuerpo ECD anti-VE-PTP

Modelo de neovascularización coroidea inducida por láser: se considera que el modelo de neovascularización coroidea representa un modelo de degeneración macular neovascular relacionada con la edad. Se generó NV coroidal como se describió anteriormente. Ver Tobe T, et al., Am. J. Pathol. 1998, Vol. 153, pp. 1641-1646. Los ratones adultos C57BL/6 tuvieron una ruptura inducida por láser de la membrana de Bruch en tres ubicaciones en cada ojo y luego se les inyectaron intravitrealmente 1 µL de 1 o 2 µg de un anticuerpo VE-PTP-ECD (IgG2a) en un ojo y vehículo (5% de dextrosa) en el otro ojo. Estos tratamientos se repitieron el día 7. Catorce días después del láser, los ratones se perfundieron con dextrano marcado con fluoresceína (2 x 10^6 de MW promedio, Sigma, St. Louis, MO) y se evaluó el grado de neovascularización en monturas planas coroidales mediante microscopía de fluorescencia. El área de CNV en cada sitio de ruptura de la membrana de Bruch se midió mediante análisis de imagen por un observador enmascarado con respecto al grupo de tratamiento. El área de CNV es el promedio de los tres sitios de ruptura en un ojo. Como se muestra en la FIG. 3, el tratamiento con el anticuerpo VE-PTP-ECD redujo significativamente la neovascularización coroidea en dosis de 1 y 2 µg versus el tratamiento con vehículo control.

Ejemplo 7

Retinopatía Isquémica Inducida por Oxígeno

Se considera que el modelo de retinopatía isquémica inducida por oxígeno representa un modelo de retinopatía diabética proliferativa. La retinopatía isquémica se produjo en ratones C57BL/6 mediante un método descrito por Smith, L. E. H., et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 35, 101-111 (1994).

Los ratones C57BL/6 en el día 7 postnatal (P7) y sus madres fueron colocados en una cámara hermética y expuestos a hiperoxia (75 ± 3% de oxígeno) durante cinco días. El oxígeno se monitorizó continuamente con un controlador de oxígeno modelo 110 PROOX (Reming Bioinstruments Co., Redfield, N.Y.). En P12, los ratones se devolvieron a una atmósfera ambiente y, bajo un microscopio de disección, se utilizó un sistema de microinyección con bomba de Harvard y pipetas de vidrio extraídas para administrar una inyección intravítrea de 1 µl de 1 o 2 µg de un anticuerpo VE-PTP-ECD en uno ojo y vehículo fueron inyectados en el otro ojo. El P17, el área de NV en la superficie de la retina se midió el P17 como se describió anteriormente. Ver Shen J, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007, Vol. 48, pp. 4335-4341. En resumen, a los ratones se les administró una inyección intraocular de 1 µl que contenía 0,5 µg de anticuerpo PECAM de rata anti-ratón (Pharmingen, San José, CA). Doce horas después, los ratones fueron sacrificados, los ojos fijados en formol al 10%. Las retinas se diseccionaron, se incubaron durante 40 minutos en 1:500 de IgG anti-rata de cabra conjugada con Alexa488 (Invitrogen, Carlsbad, California), se lavaron y se montaron completamente. Un observador enmascarado con respecto al grupo de tratamiento examinó los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia Nikon y midió el área de NV por retina mediante análisis de imagen computarizado utilizando el software ImagePro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Md.). La Fig. 4 muestra que el tratamiento con el anticuerpo VE-PTP-ECD redujo significativamente la neovascularización retiniana en dosis de 1 y 2 µg versus el tratamiento con vehículo control. La Fig. 5 muestra montajes completos retinianos representativos de un ratón tratado con vehículo frente a un ratón tratado con 2 µg del anticuerpo VE-PTP-ECD.

Ejemplo 8

Inyección subcutánea de un anticuerpo VE-PTP-ECD

El modelo de retinopatía isquémica inducida por oxígeno se realizó como se describe en el Ejemplo 7 (contención en una atmósfera de oxígeno al 75% de P5 a P12) para la dosificación intravítrea, excepto que el anticuerpo VE-PTP-ECD (1 mg / kg) se dosificó por vía subcutánea el P12 cuando los ratones regresaron a una atmósfera ambiente y nuevamente en los días P14 y P16 (tres dosis totales). La neovascularización se evaluó como se describe

anteriormente el día (P17). La Fig. 6 muestra que la dosificación subcutánea del anticuerpo VE-PTP-ECD reduce el área de neovascularización retiniana.

Ejemplo 9

El experimento descrito en el Ejemplo 8 se repitió a una dosis subcutánea de 2 mg / kg. (FIG. 7)

Si bien se describen diversas realizaciones de esta descripción, es evidente que los ejemplos básicos pueden modificarse para proporcionar otras realizaciones que utilicen o abarquen el agente de unión a HPTPβ-ECD, los métodos y los procesos de esta invención.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Aerpio Therapeutics, Inc.
Peters, Kevin
Shalwitz, Robert

<120> Tratamiento de enfermedades oculares

<130> 233106-331562

<150> US 61/546,708
<151> 13-10-2011

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 6045
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1
atgctgagcc atggagccgg gttggccttg tggatcacac tgagcctgct gcagactgga 60

ctggcggagc cagagagatg taacttcacc ctggcggagt ccaaggcctc cagccattct 120

gtgtctatcc agtggagaat tttgggctca ccctgtaact ttagcctcat ctatagcagt 180

gacaccctgg gggccgcgtt gtgccctacc tttcggatag acaacaccac atacggatgt 240

aaccttcaag atttacaagc aggaaccatc tataacttca agattatttc tctggatgaa 300

gagagaactg tggtcttgca aacagatcct ttacctcctg ctaggtttgg agtcagtaaa 360

gagaagacga cttcaaccgg cttgcatgtt tggtggactc cttcttccgg aaaagtcacc 420

tcatatgagg tgcaattatt tgatgaaaat aaccaaaaga tacaggggtt tcaaattcaa 480

gaaagtactt catggaatga atacactttt ttcaatctca ctgctggtag taaatacaat 540

attgccatca cagctgtttc tggaggaaaa cgttcttttt cagtttatac caatggatca 600

acagtgccat ctccagtgaa agatattggt atttccacaa aagccaattc tctcctgatt 660

tcctggtccc atggttctgg gaatgtggaa cgataccggc tgatgctaat ggataaaggg 720

atcctagttc atggcggtgt tgtggacaaa catgctactt cctatgcttt tcacgggctg 780

tcccctggct acctctacaa cctcactgtt atgactgagg ctgcagggct gcaaaactac 840

aggtggaaac tagtcaggac agcccccatg gaagtctcaa atctgaaggt gacaaatgat 900

ggcagtttga cctctctaaa agtcaaatgg caaagacctc ctggaaatgt ggattcttac 960

aatatcaccc tgtctcacaa agggaccatc aaggaatcca gagtattagc accttggatt 1020

actgaaactc actttaaaga gttagtcccc ggtcgacttt atcaagttac tgtcagctgt 1080

gtctctggtg aactgtctgc tcagaagatg gcagtgggca gaacatttcc agacaaagtt 1140

gcaaacctgg aggcaaacaa taatggcagg atgaggtctc ttgtagtgag ctggtcgccc 1200

cctgctggag actgggagca gtatcggatc ctactcttca atgattctgt ggtgctgctc 1260

aacatcactg tgggaaagga agaaacacag tatgtcatgg atgacacggg gctcgtaccg 1320

ggaagacagt atgaggtgga agtcattgtt gagagtggaa atttgaagaa ttctgagcgt 1380

tgccaaggca ggacagtccc cctggctgtc ctccagcttc gtgtcaaaca tgccaatgaa 1440

acctcactga gtatcatgtg gcagacccct gtagcagaat gggagaaata catcatttcc 1500

ctagctgaca gagacctctt actgatccac aagtcactct ccaaagatgc caaagaattc 1560

acttttactg acctggtgcc tggacgaaaa tacatggcta cagtcaccag tattagtgga 1620

gacttaaaaa attcctcttc agtaaaagga agaacagtgc ctgcccaagt gactgacttg 1680

catgtggcca accaaggaat gaccagtagt ctgtttacta actggaccca ggcacaagga 1740

gacgtagaat tttaccaagt cttactgatc catgaaaatg tggtcattaa aaatgaaagc 1800

atctccagtg agaccagcag atacagcttc cactctctca agtccggcag cctgtactcc 1860

gtggtggtaa caacagtgag tggagggatc tcttcccgac aagtggttgt ggagggaaga 1920

acagtccctt ccagtgtgag tggagtaacg gtgaacaatt ccggtcgtaa tgactacctc 1980

agcgtttcct ggctcgtggc gcccggagat gtggataact atgaggtaac attgtctcat 2040

gacggcaagg tggttcagtc ccttgtcatt gccaagtctg tcagagaatg ttccttcagc 2100

tccctcaccc caggccgcct ctacaccgtg accataacta caaggagtgg caagtatgaa 2160

aatcactcct tcagccaaga gcggacagtg cctgacaaag tccagggagt cagtgttagc 2220

aactcagcca ggagtgacta tttaagggta tcctgggtgc atgccactgg agactttgat 2280

cactatgaag tcaccattaa aaacaaaaac aacttcattc aaactaaaag cattcccaag 2340

tcagaaaacg aatgtgtatt tgttcagcta gtccctggac ggttgtacag tgtcactgtt 2400

actacaaaaa gtggacaata tgaagccaat gaacaaggga atgggagaac aattccagag 2460

cctgttaagg atctaacatt gcgcaacagg agcactgagg acttgcatgt gacttggtca 2520

ggagctaatg gggatgtcga ccaatatgag atccagctgc tcttcaatga catgaaagta 2580

tttcctcctt ttcaccttgt aaataccgca accgagtatc gatttacttc cctaacacca 2640

ggccgccaat acaaaattct tgtcttgacg attagcgggg atgtacagca gtcagccttc 2700

attgagggct tcacagttcc tagtgctgtc aaaaatattc acatttctcc caatggagca 2760

acagatagcc tgacggtgaa ctggactcct ggtgggggag acgttgattc ctacacggtg 2820

tcggcattca ggcacagtca aaaggttgac tctcagacta ttcccaagca cgtctttgag 2880

cacacgttcc acagactgga ggccggggag cagtaccaga tcatgattgc ctcagtcagc 2940

gggtccctga agaatcagat aaatgtggtt gggcggacag ttccagcatc tgtccaagga 3000

gtaattgcag acaatgcata cagcagttat tccttaatag taagttggca aaaagctgct 3060

ggtgtggcag aaagatatga tatcctgctt ctaactgaaa atggaatcct tctgcgcaac 3120

acatcagagc cagccaccac taagcaacac aaatttgaag atctaacacc aggcaagaaa 3180

tacaagatac agatcctaac tgtcagtgga ggcctcttta gcaaggaagc ccagactgaa 3240

ggccgaacag tcccagcagc tgtcaccgac ctgaggatca cagagaactc caccaggcac 3300

ctgtccttcc gctggaccgc ctcagagggg gagctcagct ggtacaacat ctttttgtac 3360

aacccagatg ggaatctcca ggagagagct caagttgacc cactagtcca gagcttctct 3420

ttccagaact tgctacaagg cagaatgtac aagatggtga ttgtaactca cagtggggag 3480

ctgtctaatg agtctttcat atttggtaga acagtcccag cctctgtgag tcatctcagg 3540

gggtccaatc ggaacacgac agacagcctt tggttcaact ggagtccagc ctctggggac 3600

tttgactttt atgagctgat tctctataat cccaatggca caaagaagga aaactggaaa 3660

gacaaggacc tgacggagtg gcggtttcaa ggccttgttc ctggaaggaa gtacgtgctg 3720

tgggtggtaa ctcacagtgg agatctcagc aataaagtca cagcggagag cagaacagct 3780

ccaagtcctc ccagtcttat gtcatttgct gacattgcaa acacatcctt ggccatcacg 3840

tggaaagggc ccccagactg gacagactac aacgactttg agctgcagtg gttgcccaga 3900

gatgcactta ctgtcttcaa cccctacaac aacagaaaat cagaaggacg cattgtgtat 3960

ggtcttcgtc cagggagatc ctatcaattc aacgtcaaga ctgtcagtgg tgattcctgg 4020

aaaacttaca gcaaaccaat ttttggatct gtgaggacaa agcctgacaa gatacaaaac 4080

ctgcattgcc ggcctcagaa ctccacggcc attgcctgtt cttggatccc tcctgattct 4140

gactttgatg gttatagtat tgaatgccgg aaaatggaca cccaagaagt tgagttttcc 4200

agaaagctgg agaaagaaaa atctctgctc aacatcatga tgctagtgcc ccataagagg 4260

tacctggtgt ccatcaaagt gcagtcggcc ggcatgacca gcgaggtggt tgaagacagc 4320

actatcacaa tgatagaccg ccccccctcct ccacccccac acattcgtgt gaatgaaaag 4380

gatgtgctaa ttagcaagtc ttccatcaac tttactgtca actgcagctg gttcagcgac 4440

accaatggag ctgtgaaata cttcacagtg gtggtgagag aggctgatgg cagtgatgag 4500

ctgaagccag aacagcagca ccctctccct tcctacctgg agtacaggca caatgcctcc 4560

attcgggtgt atcagactaa ttattttgcc agcaaatgtg ccgaaaatcc taacagcaac 4620

tccaagagtt ttaacattaa gcttggagca gagatggaga gcttaggtgg aaaacgcgat 4680

cccactcagc aaaaattctg tgatggacca ctgaagccac acactgccta cagaatcagc 4740

attcgagctt ttacacagct ctttgatgag gacctgaagg aattcacaaa gccactctat 4800

tcagacacat ttttttcttt acccatcact actgaatcag agcccttgtt tggagctatt 4860

gaaggtgtga gtgctggtct gtttttaatt ggcatgctag tggctgttgt tgccttattg 4920

atctgcagac agaaagtgag ccatggtcga gaaagaccct ctgcccgtct gagcattcgt 4980

```
agggatcgac cattatctgt ccacttaaac ctgggccaga aaggtaaccg gaaaacttct     5040

tgtccaataa aaataaatca gtttgaaggg catttcatga agctacaggc tgactccaac     5100

taccttctat ccaaggaata cgaggagtta aaagacgtgg gccgaaacca gtcatgtgac     5160

attgcactct tgccggagaa tagagggaaa aatcgataca acaatatatt gccctatgat     5220

gccacgcgag tgaagctctc caatgtagat gatgatcctt gctctgacta catcaatgcc     5280

agctacatcc ctggcaacaa cttcagaaga gaatacattg tcactcaggg accgcttcct     5340

ggcaccaagg atgacttctg gaaaatggtg tgggaacaaa acgttcacaa catcgtcatg     5400

gtgacccagt gtgttgagaa gggccgagta aagtgtgacc attactggcc agcggaccag     5460

gattccctct actatgggga cctcatcctg cagatgctct cagagtccgt cctgcctgag     5520

tggaccatcc gggagtttaa gatatgcggt gaggaacagc ttgatgcaca cagactcatc     5580

cgccactttc actatacggt gtggccagac catggagtcc cagaaaccac ccagtctctg     5640

atccagtttg tgagaactgt cagggactac atcaacagaa gcccgggtgc tgggcccact     5700

gtggtgcact gcagtgctgg tgtgggtagg actggaacct ttattgcatt ggaccgaatc     5760

ctccagcagt tagactccaa agactctgtg gacatttatg gagcagtgca cgacctaaga     5820

cttcacaggg ttcacatggt ccagactgag tgtcagtatg tctacctaca tcagtgtgta     5880

agagatgtcc tcagagcaag aaagctacgg agtgaacaag aaaacccctt gtttccaatc     5940

tatgaaaatg tgaatccaga gtatcacaga gatccagtct attcaaggca ttgagaatgt     6000

acctgaagag ctcctggata aaaattattc actgtgtgat ttgtt                     6045
```

<210> 2
<211> 1997
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Val Leu Leu Asn Ile Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr Gln Tyr Val
            420                 425                 430

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

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

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

Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro Val Ala Glu Trp Glu Lys
                485                 490                 495

Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu Leu Leu Ile His Lys Ser
            500                 505                 510

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

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

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

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

Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His Glu
```

```
            580                 585                 590

Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser Ser Glu Thr Ser Arg Tyr
        595                 600                 605

Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr
    610                 615                 620

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

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

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

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

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

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

Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln Gly
                725                 730                 735

Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Arg Val Ser Trp
            740                 745                 750

Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys Asn
        755                 760                 765

Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile Pro Lys Ser Glu Asn Glu
    770                 775                 780

Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr Val
785                 790                 795                 800

Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn Glu Gln Gly Asn Gly Arg
                805                 810                 815

Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Arg Asn Arg Ser Thr
            820                 825                 830
```

```
Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala Asn Gly Asp Val Asp Gln
        835                 840                 845

Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro Pro Phe
    850                 855                 860

His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Thr Pro
865                 870                 875                 880

Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val Gln
                885                 890                 895

Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Ala Val Lys Asn
            900                 905                 910

Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp Ser Leu Thr Val Asn Trp
        915                 920                 925

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ser  Arg Lys Leu Glu Lys  Glu Lys Ser Leu Leu  Asn Ile Met
    1400                1405                1410

Met Leu  Val Pro His Lys Arg  Tyr Leu Val Ser Ile  Lys Val Gln
    1415                1420                1425

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

Met Ile  Asp Arg Pro Pro Pro  Pro Pro Pro His Ile  Arg Val Asn
    1445                1450                1455

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

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

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

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

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

Ala Glu  Asn Pro Asn Ser Asn  Ser Lys Ser Phe Asn  Ile Lys Leu
    1535                1540                1545

Gly Ala  Glu Met Glu Ser Leu  Gly Gly Lys Cys Asp  Pro Thr Gln
```

```
    1550                1555                1560

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

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

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

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

Ser Ala  Gly Leu Phe Leu Ile  Gly Met Leu Val Ala  Val Val Ala
    1625                1630                1635

Leu Leu  Ile Cys Arg Gln Lys  Val Ser His Gly Arg  Glu Arg Pro
    1640                1645                1650

Ser Ala  Arg Leu Ser Ile Arg  Arg Asp Arg Pro Leu  Ser Val His
    1655                1660                1665

Leu Asn  Leu Gly Gln Lys Gly  Asn Arg Lys Thr Ser  Cys Pro Ile
    1670                1675                1680

Lys Ile  Asn Gln Phe Glu Gly  His Phe Met Lys Leu  Gln Ala Asp
    1685                1690                1695

Ser Asn  Tyr Leu Leu Ser Lys  Glu Tyr Glu Glu Leu  Lys Asp Val
    1700                1705                1710

Gly Arg  Asn Gln Ser Cys Asp  Ile Ala Leu Leu Pro  Glu Asn Arg
    1715                1720                1725

Gly Lys  Asn Arg Tyr Asn Asn  Ile Leu Pro Tyr Asp  Ala Thr Arg
    1730                1735                1740

Val Lys  Leu Ser Asn Val Asp  Asp Asp Pro Cys Ser  Asp Tyr Ile
    1745                1750                1755

Asn Ala  Ser Tyr Ile Pro Gly  Asn Asn Phe Arg Arg  Glu Tyr Ile
    1760                1765                1770

Val Thr  Gln Gly Pro Leu Pro  Gly Thr Lys Asp Asp  Phe Trp Lys
    1775                1780                1785
```

```
Met Val  Trp Glu Gln Asn Val  His Asn Ile Val Met  Val Thr Gln
    1790                 1795                 1800

Cys Val  Glu Lys Gly Arg Val  Lys Cys Asp His Tyr  Trp Pro Ala
    1805                 1810                 1815

Asp Gln  Asp Ser Leu Tyr Tyr  Gly Asp Leu Ile Leu  Gln Met Leu
    1820                 1825                 1830

Ser Glu  Ser Val Leu Pro Glu  Trp Thr Ile Arg Glu  Phe Lys Ile
    1835                 1840                 1845

Cys Gly  Glu Glu Gln Leu Asp  Ala His Arg Leu Ile  Arg His Phe
    1850                 1855                 1860

His Tyr  Thr Val Trp Pro Asp  His Gly Val Pro Glu  Thr Thr Gln
    1865                 1870                 1875

Ser Leu  Ile Gln Phe Val Arg  Thr Val Arg Asp Tyr  Ile Asn Arg
    1880                 1885                 1890

Ser Pro  Gly Ala Gly Pro Thr  Val Val His Cys Ser  Ala Gly Val
    1895                 1900                 1905

Gly Arg  Thr Gly Thr Phe Ile  Ala Leu Asp Arg Ile  Leu Gln Gln
    1910                 1915                 1920

Leu Asp  Ser Lys Asp Ser Val  Asp Ile Tyr Gly Ala  Val His Asp
    1925                 1930                 1935

Leu Arg  Leu His Arg Val His  Met Val Gln Thr Glu  Cys Gln Tyr
    1940                 1945                 1950

Val Tyr  Leu His Gln Cys Val  Arg Asp Val Leu Arg  Ala Arg Lys
    1955                 1960                 1965

Leu Arg  Ser Glu Gln Glu Asn  Pro Leu Phe Pro Ile  Tyr Glu Asn
    1970                 1975                 1980

Val Asn  Pro Glu Tyr His Arg  Asp Pro Val Tyr Ser  Arg His
    1985                 1990                 1995
```

<210> 3
<211> 1631
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Val Leu Leu Asn Ile Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr Gln Tyr Val
            420                 425                 430

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

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

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

Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro Val Ala Glu Trp Glu Lys
                485                 490                 495

Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu Leu Leu Ile His Lys Ser
            500                 505                 510
```

```
Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Val Pro Gly
        515                 520                 525

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

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

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

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

Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser Ser Glu Thr Ser Arg Tyr
        595                 600                 605

Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr
    610                 615                 620

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

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

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

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

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

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

Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln Gly
                725                 730                 735

Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Arg Val Ser Trp
            740                 745                 750

Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys Asn
```

```
        755                 760                 765

Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile Pro Lys Ser Glu Asn Glu
    770                 775                 780

Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr Val
785                 790                 795                 800

Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn Glu Gln Gly Asn Gly Arg
                805                 810                 815

Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Arg Asn Arg Ser Thr
            820                 825                 830

Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala Asn Gly Asp Val Asp Gln
        835                 840                 845

Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro Pro Phe
    850                 855                 860

His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Thr Pro
865                 870                 875                 880

Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val Gln
                885                 890                 895

Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Ala Val Lys Asn
            900                 905                 910

Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp Ser Leu Thr Val Asn Trp
        915                 920                 925

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ser  Arg Lys Leu Glu Lys  Glu Lys Ser Leu Leu  Asn Ile Met
    1400                 1405                 1410

Met Leu  Val Pro His Lys Arg  Tyr Leu Val Ser Ile  Lys Val Gln
    1415                 1420                 1425

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

Met Ile  Asp Arg Pro Pro Pro  Pro Pro Pro His Ile  Arg Val Asn
    1445                 1450                 1455

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

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

```
Thr Val  Val Val Arg Glu Ala  Asp Gly Asn Asp Glu  Leu Lys Pro
    1490                 1495                 1500

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

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

Ala Glu  Asn Pro Asn Ser Asn  Ser Lys Ser Phe Asn  Ile Lys Leu
    1535                 1540                 1545

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

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

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

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

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

Arg His  His His His His His  Gly
    1625                 1630
```

<210> 4
<211> 1621
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
```

305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Val Val Leu Leu Asn Ile Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr Gln Tyr Val
420 425 430

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

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

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

Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro Val Ala Glu Trp Glu Lys
485 490 495

Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu Leu Leu Ile His Lys Ser
500 505 510

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

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

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

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

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

Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser Ser Glu Thr Ser Arg Tyr
       595                 600                 605

Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr
   610                 615                 620

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

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

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

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

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

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

Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln Gly
               725                 730                 735

Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Arg Val Ser Trp
           740                 745                 750

Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys Asn
       755                 760                 765

Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile Pro Lys Ser Glu Asn Glu
   770                 775                 780

Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr Val
785                 790                 795                 800

Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn Glu Gln Gly Asn Gly Arg
               805                 810                 815
```

```
Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Arg Asn Arg Ser Thr
            820                 825                 830

Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala Asn Gly Asp Val Asp Gln
        835                 840                 845

Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro Pro Phe
    850                 855                 860

His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Thr Pro
865                 870                 875                 880

Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val Gln
                885                 890                 895

Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Ala Val Lys Asn
            900                 905                 910

Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp Ser Leu Thr Val Asn Trp
        915                 920                 925

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Leu  Gln Trp Leu Pro Arg  Asp Ala Leu Thr Val  Phe Asn Pro
```

```
    1295                1300                1305

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

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

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

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

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

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

Phe Ser  Arg Lys Leu Glu Lys  Glu Lys Ser Leu Leu  Asn Ile Met
    1400                1405                1410

Met Leu  Val Pro His Lys Arg  Tyr Leu Val Ser Ile  Lys Val Gln
    1415                1420                1425

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

Met Ile  Asp Arg Pro Pro Pro  Pro Pro Pro His Ile  Arg Val Asn
    1445                1450                1455

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

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

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

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

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

```
Ala Glu  Asn Pro Asn Ser Asn  Ser Lys Ser Phe Asn  Ile Lys Leu
    1535                1540                1545

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

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

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

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

Ile Thr  Thr Glu Ser Glu Pro  Leu Phe Gly Ala Ile  Glu
    1610                1615                1620
```

<210> 5
<211> 6199
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 5

```
ggcacgaggg cggctgccac ggcccttgag catcgccagc cccgagggta gcgcgctgcg        60

cccgcccgca gggcgcgctg agcgctcaac aagtggtacc cagaagtgcc ctggctggcc       120

tcccagcgag atgctgaggc atggagccct aacggccttg tggataacac tgagcgtcgt       180

gcagactgga gtggcagagc aagtgaaatg taacttcaca ctgttggagt ccagggtctc       240

tagcttgtca gcgtctatcc agtggaggac tttcgcgtca ccctgtaact ttagcctcat       300

ctacagcagt gatacctcgg ggcccatgtg gtgccatcct attcggatag acaactttac       360

ctacggatgt aaccccaagg atttacaagc agggaccgtc tataacttca ggattgtttc       420

tctggatgga gaagagagca ctctggtctt acagacagat ccgttgcctc ctgccaggtt       480

tgaagtcaat cgggagaaaa cagcatcaac caccctgcag gtccggtgga ctccctcttc       540

tggaaaagtc tcctggtatg aggtgcaatt atttgatcat aacaatcaaa agatacaaga       600

agtccaagtt caagaaagta ccacctggag ccaatatact tttctgaacc tcactgaggg       660

taacagttac aaagttgcca tcacagctgt ttcgggagaa aagcgctcct ttccggtgta       720

tatcaatggc tctacagtac catctccagt gaaagatctt ggcatttccc ccaatcctaa       780

ttctctccta atttcctggt ctcgtggttc tgggaatgtg gaacaataca ggctggtgct       840

aatggataaa ggggccatcg ttcaagacac aaacgtggac aggcgtgata cttcttatgc       900

ttttcacgag ctgacccctg gccacctcta caacctcact attgtcacca tggcctcggg       960

actgcaaaac tccaggtgga aactggtgag gaccgctccc atggaagtct caaatctgaa      1020
```

ggtgacaaat gacgggaggt tgacctctct aaatgtgaag tggcagaaac cccctgggga 1080

tgtagattcc tacagcatta ccctgtctca ccaagggacc atcaaagaat ccaaaacatt 1140

agcacctcct gttactgaaa ctcaatttaa ggacttagtc cctggacggc tttaccaagt 1200

gaccatcagc tgcatctctg gtgagctctc tgctgagaag tcagcagcgg ggagaacagt 1260

tccagaaaaa gtgaggaatc tggtttccta caacgagatt tggatgaagt cctttacagt 1320

gaactggacg ccccctgctg gagattggga gcattatcgt atcgtgctct tcaatgaatc 1380

cttggtcttg ctcaacacca cagtgggaaa ggaagaaacg cactatgcct tggatggctt 1440

ggagctcata ccaggaagac agtatgagat agaagtcatt gttgagagcg gaaatctgcg 1500

gaattccgag cgctgtcaag gcaggacagt acccctggct gtcctccagc ttcgcgtcaa 1560

acacgctaac gaaacttcac tgggcatcac gtggcgggcc cctctaggcg aatgggagaa 1620

atacatcatt tcgttgatgg acagagagct cttggtcatc cacaagtcac tctccaaaga 1680

tgccaaagaa ttcactttta cagacctgat gcctggacgg aattacaagg ctactgtcac 1740

tagcatgagt ggagatttaa aacagtcatc ttcaatcaaa ggaagaacag tgcctgccca 1800

ggtgactgac ctgcacgtca acaaccaagg gatgaccagt agtctgttca ctaactggac 1860

aaaggcactg ggagatgtag agttctacca agttttactg atccatgaaa atgtggttgt 1920

caagaacgag agtgtttcca gtgataccag cagatacagc ttccgcgccc tgaaacccgg 1980

cagcctctac tccgtggtgg tgaccacggt gagtggaggg atctcctccc ggcaggtggt 2040

ggcggaagga agaacagtcc cgtccagcgt gagtggggtg acagtcaaca attctggccg 2100

gaatgactac ctcagcgttt cctggctgcc ggcgcctgga gaagtggatc actacgtggt 2160

gagcctctcc cacgagggca aggtggatca gttcctcatc atcgccaaat ctgtcagcga 2220

gtgttccttc agctccctca ccccgggccg cctctacaac gtcactgtaa ccaccaagag 2280

cggcaattat gcaagccact ccttcaccga ggaacggaca gtgccagaca aggtccaggg 2340

aatcagtgtt agcaactctg ccagaagcga ctacttaaag gtgtcctggg tgcatgccac 2400

tggagacttt gaccactatg aagtcaccat caaaaacaga gaaagcttca ttcaaaccaa 2460

aaccatcccc aagtcagaaa atgagtgtga atttattgag ctggttcctg gacgcctgta 2520

cagcgtcact gtcagtacaa agagtggaca atatgaagcc agtgaacagg ggacagggag 2580

aacgatccca gagcctgtga aggatctcac ccttctcaac aggagtacgg aggatctcca 2640

tgtgacttgg tcaagagcca atggggatgt tgatcagtac gaggtccagc tgctcttcaa 2700

cgacatgaaa gtcttccctc atattcacct tgtgaacaca gcaactgagt ataagttcac 2760

ggcgctcacg ccggggcgcc attacaaaat cctcgtcctg accatcagtg gcgatgtcca 2820

gcagtcagcc ttcattgaag gcctcccagt tcccagcact gtcaaaaaca ttcacatttc 2880

tgccaatgga gccacggata ggctgatggt aacctggagc cctggtggcg gggatgtgga 2940

ctcctatgtg gtgtctgcat tcagacagga cgagaaggtt gactctcaga ccattcccaa 3000

gcatgcctcg gagcacacgt tccacaggct ggaggccgga gccaagtaca ggatcgccat 3060

tgtttctgtc agtgggtccc tgagaaacca gatagatgcg ctcggacaga cagtcccagc 3120

gtctgtccag ggagtcgtcg cagccaatgc atacagcagt aattccttaa cagtaagttg 3180

gcagaaagcc cttggtgtgg cagaaagata cgatatcctg cttctaaacg agaatgggct 3240

tcttttgagc aacgtgtcag agccagctac ggcaagacag cacaaatttg aagatctaac 3300

gccaggcaag aaatacaaga tgcagatcct gactgtcagc ggaggcctct tcagtaaaga 3360

atctcaggct gaaggccgaa cagtcccagc agctgtcacc aatctgagga tcacagagaa 3420

ctccagtaga tacctgtcct tcggctggac cgcctcggag ggtgaactca gctggtacaa 3480

catcttcctc tacaacccag acaggactct tcaggagcga gctcaagttg acccgctagt 3540

ccagagcttc tctttccaga acttgctaca aggcagaatg tacaagatgg tgattgtcac 3600

tcacagtggg gagctgtcca atgagtcatt tatattcggc agaacagttc ctgctgccgt 3660

gaaccatctc aaaggctccc atcggaacac gacagacagc ctgtggttca gctggagccc 3720

agcctccggg gactttgact tctatgagct gattctttac aatcccaacg gcacgaagaa 3780

ggagaactgg aaagaaaagg acgtgacaga gtggcgtttc caaggtcttg ttcctggaag 3840

gaaatacacc ctgtatgtgg tgactcacag tggggacctc agcaataaag tcacagggga 3900

gggcagaaca gccccaagtc ctccgagtct tttgtcattc gctgatgttg caaacacctc 3960

cttggctatc acctggaagg gacccccaga ctggacagat tacaatgact ttgagctgca 4020

gtggttccct ggagatgcac ttaccatctt caacccctac agcagcagaa agtcagaagg 4080

acgcattgtg tacgggcttc acccagggag gtcctatcaa ttcagtgtca agactgtgag 4140

cggggactcc tggaaaacct acagcaaacc aatttctggg tctgtgagga caaagccaga 4200

caagatacaa aacctgcatt gccgccccca gaactccacg gccattgcct gctcttggat 4260

acctcctgac tccgactttg atggctacag cattgagtgc cgaaaaatgg atacccaaga 4320

aatcgagttt tccagaaagc tggagaaaga aaaatcactg ctcaacatca tgatgttagt 4380

acctcataag aggtacctgg tgtccatcaa ggtgcagtcg gccggcatga ccagtgaggt 4440

ggttgaagat agcaccatca ccatgataga ccgcccgcct caaccgcctc cacacatccg 4500

tgtgaatgaa aaggatgtgc taatcagcaa atcttccatc aactttactg tcaactgcag 4560

ctggttcagc gacaccaacg gagcggttaa atactttgct gtggtggtga gagaggccga 4620

cagcatggat gagttgaagc cagaacagca gcaccctctc ccttcctacc tggagtacag 4680

acacaacgcc tccatccgag tctaccagac caattatttt gccagcaaat gtgctgaaag 4740

tcccgacagc agttctaaaa gtttcaacat taagcttgga gcagagatgg acagcctcgg 4800

tggcaaatgt gatcccagtc agcagaaatt ctgtgatgga ccgctgaagc cacacaccgc 4860

ctacagaatc agcatccggg cttttacaca gctatttgac gaggacttga aagagttcac 4920

caaacctctc tactcggata cgttcttctc tatgcccatc accacagagt cagagccctt 4980

gtttggagtt attgaaggtg tgagtgctgg cctgtttcta attggcatgc tggtggccct 5040

tgttgccttc ttcatctgca gacagaaagc tagccacagc agggaaaggc catctgcccg 5100

gctcagcatt cgtagggacc ggcctttgtc tgtccatctg aatctgggcc agaaaggcaa 5160

ccggaaaact tcttgcccca taaagatcaa tcagtttgaa gggcatttca tgaagctgca 5220

ggcagactcc aactaccttc tatccaagga atatgaggac ttaaaagacg tgggtagaag 5280

ccagtcatgt gacattgccc tcttgcctga gaatcgaggg aaaaatcgat acaacaacat 5340

attgccttat gatgcctcaa gagtgaagct ctcgaatgtc gatgacgacc cttgctctga 5400

ctacatcaac gccagctaca tccccggtaa caacttcaga cgagaataca tcgccactca 5460

gggaccgctt ccaggcacca aggatgactt ctggaagatg gcgtgggagc agaacgttca 5520

caacatcgtc atggtgaccc agtgtgttga aaagggccga gtgaagtgtg accattactg 5580

gccagcagac caggaccccc tctactacgg tgatctcatc ctacagatgg tctcggagtc 5640

cgtgctcccc gagtggacca tcagggagtt taagatatgc agtgaagaac agttggatgc 5700

acacagactc atccgtcact ttcactacac ggtgtggcca gaccatgggg tcccagagac 5760

cacccagtcc ctgatccaat ttgtgaggac agtcagggac tacatcaaca gaagccccgg 5820

ggctgggccc accgtagtgc actgcagcgc tggtgtgggc agaacaggga cgttcgttgc 5880

cctggaccgg atcctccagc agttggactc taaggactcc gtggacattt atggggcagt 5940

gcatgaccta agactccaca gggttcacat ggtccagacc gagtgtcaat atgtgtatct 6000

gcatcagtgt gtaagagacg tcctcagagc aaagaaactg cggaacgagc aagagaaccc 6060

cctgtttccg atttatgaga atgtgaatcc agagtatcac agagatgcaa tctactcgag 6120

acattaagaa ttcacctgaa gatcccctgg ataaaagcgt ttcactgtgt gactttaaaa 6180

aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 6199

<210> 6
<211> 1998
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Met Ala Ser Gly Leu Gln Asn Ser Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr
```

```
        275                 280                 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln
                725                 730                 735

Gly Ile Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Lys Val Ser
            740                 745                 750

Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys
        755                 760                 765

Asn Arg Glu Ser Phe Ile Gln Thr Lys Thr Ile Pro Lys Ser Glu Asn
    770                 775                 780
```

```
Glu Cys Glu Phe Ile Glu Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr
785                 790                 795                 800

Val Ser Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Ser Glu Gln Gly Thr Gly
                805                 810                 815

Arg Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Leu Asn Arg Ser
            820                 825                 830

Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Arg Ala Asn Gly Asp Val Asp
        835                 840                 845

Gln Tyr Glu Val Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro His
    850                 855                 860

Ile His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Thr
865                 870                 875                 880

Pro Gly Arg His Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val
                885                 890                 895

Gln Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Leu Pro Val Pro Ser Thr Val Lys
            900                 905                 910

Asn Ile His Ile Ser Ala Asn Gly Ala Thr Asp Arg Leu Met Val Thr
        915                 920                 925

Trp Ser Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Val Val Ser Ala Phe
    930                 935                 940

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

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

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

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

Ser Ser  Asn Ser Leu Thr Val  Ser Trp Gln Lys Ala  Leu Gly Val
    1010                1015                1020

Ala Glu  Arg Tyr Asp Ile Leu  Leu Leu Asn Glu Asn  Gly Leu Leu
    1025                1030                1035
```

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

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

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

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

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

Ser Trp  Tyr Asn Ile Phe Leu  Tyr Asn Pro Asp Arg  Thr Leu Gln
    1115                1120                1125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro  Ser Leu Leu Ser Phe  Ala Asp Val Ala Asn  Thr Ser Leu
```

```
    1265                1270                1275

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

Phe Glu  Leu Gln Trp Phe Pro  Gly Asp Ala Leu Thr  Ile Phe Asn
    1295                1300                1305

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

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

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

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

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

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

Glu Phe  Ser Arg Lys Leu Glu  Lys Glu Lys Ser Leu  Leu Asn Ile
    1400                1405                1410

Met Met  Leu Val Pro His Lys  Arg Tyr Leu Val Ser  Ile Lys Val
    1415                1420                1425

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser  Ala Gly Leu Phe Leu  Ile Gly Met Leu Val  Ala Leu Val
    1625                1630                1635

Ala Phe  Phe Ile Cys Arg Gln  Lys Ala Ser His Ser  Arg Glu Arg
    1640                1645                1650

Pro Ser  Ala Arg Leu Ser Ile  Arg Arg Asp Arg Pro  Leu Ser Val
    1655                1660                1665

His Leu  Asn Leu Gly Gln Lys  Gly Asn Arg Lys Thr  Ser Cys Pro
    1670                1675                1680

Ile Lys  Ile Asn Gln Phe Glu  Gly His Phe Met Lys  Leu Gln Ala
    1685                1690                1695

Asp Ser  Asn Tyr Leu Leu Ser  Lys Glu Tyr Glu Asp  Leu Lys Asp
    1700                1705                1710

Val Gly  Arg Ser Gln Ser Cys  Asp Ile Ala Leu Leu  Pro Glu Asn
    1715                1720                1725

Arg Gly  Lys Asn Arg Tyr Asn  Asn Ile Leu Pro Tyr  Asp Ala Ser
    1730                1735                1740
```

```
Arg Val  Lys Leu Ser Asn Val  Asp Asp Asp Pro Cys  Ser Asp Tyr
    1745                1750                1755

Ile Asn  Ala Ser Tyr Ile Pro  Gly Asn Asn Phe Arg  Arg Glu Tyr
    1760                1765                1770

Ile Ala  Thr Gln Gly Pro Leu  Pro Gly Thr Lys Asp  Asp Phe Trp
    1775                1780                1785

Lys Met  Ala Trp Glu Gln Asn  Val His Asn Ile Val  Met Val Thr
    1790                1795                1800

Gln Cys  Val Glu Lys Gly Arg  Val Lys Cys Asp His  Tyr Trp Pro
    1805                1810                1815

Ala Asp  Gln Asp Pro Leu Tyr  Tyr Gly Asp Leu Ile  Leu Gln Met
    1820                1825                1830

Val Ser  Glu Ser Val Leu Pro  Glu Trp Thr Ile Arg  Glu Phe Lys
    1835                1840                1845

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

Phe His  Tyr Thr Val Trp Pro  Asp His Gly Val Pro  Glu Thr Thr
    1865                1870                1875

Gln Ser  Leu Ile Gln Phe Val  Arg Thr Val Arg Asp  Tyr Ile Asn
    1880                1885                1890

Arg Ser  Pro Gly Ala Gly Pro  Thr Val Val His Cys  Ser Ala Gly
    1895                1900                1905

Val Gly  Arg Thr Gly Thr Phe  Val Ala Leu Asp Arg  Ile Leu Gln
    1910                1915                1920

Gln Leu  Asp Ser Lys Asp Ser  Val Asp Ile Tyr Gly  Ala Val His
    1925                1930                1935

Asp Leu  Arg Leu His Arg Val  His Met Val Gln Thr  Glu Cys Gln
    1940                1945                1950

Tyr Val  Tyr Leu His Gln Cys  Val Arg Asp Val Leu  Arg Ala Lys
    1955                1960                1965

Lys Leu  Arg Asn Glu Gln Glu  Asn Pro Leu Phe Pro  Ile Tyr Glu
    1970                1975                1980

Asn Val  Asn Pro Glu Tyr His  Arg Asp Ala Ile Tyr  Ser Arg His
    1985                1990                1995
```

<210> 7
<211> 1619
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly
```

```
    450                 455                 460

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln
                725                 730                 735

Gly Ile Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Lys Val Ser
            740                 745                 750

Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys
        755                 760                 765

Asn Arg Glu Ser Phe Ile Gln Thr Lys Thr Ile Pro Lys Ser Glu Asn
    770                 775                 780

Glu Cys Glu Phe Ile Glu Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr
785                 790                 795                 800

Val Ser Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Ser Glu Gln Gly Thr Gly
                805                 810                 815

Arg Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Leu Asn Arg Ser
            820                 825                 830

Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Arg Ala Asn Gly Asp Val Asp
        835                 840                 845

Gln Tyr Glu Val Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro His
    850                 855                 860

Ile His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Thr
865                 870                 875                 880

Pro Gly Arg His Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val
                885                 890                 895

Gln Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Leu Pro Val Pro Ser Thr Val Lys
            900                 905                 910

Asn Ile His Ile Ser Ala Asn Gly Ala Thr Asp Arg Leu Met Val Thr
        915                 920                 925

Trp Ser Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Val Val Ser Ala Phe
    930                 935                 940

Arg Gln Asp Glu Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile Pro Lys His Ala Ser
945                 950                 955                 960
```

```
Glu His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Ala Lys Tyr Arg Ile Ala
               965                 970                 975

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

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

Ser Ser  Asn Ser Leu Thr Val  Ser Trp Gln Lys Ala  Leu Gly Val
    1010                1015                1020

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

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

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

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

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

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

Ser Trp  Tyr Asn Ile Phe Leu  Tyr Asn Pro Asp Arg  Thr Leu Gln
    1115                1120                1125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro  Ser Leu Leu Ser Phe  Ala Asp Val Ala Asn  Thr Ser Leu
    1265                 1270                 1275

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

Phe Glu  Leu Gln Trp Phe Pro  Gly Asp Ala Leu Thr  Ile Phe Asn
    1295                 1300                 1305

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

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

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

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

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

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

Glu Phe  Ser Arg Lys Leu Glu  Lys Glu Lys Ser Leu  Leu Asn Ile
    1400                 1405                 1410

Met Met  Leu Val Pro His Lys  Arg Tyr Leu Val Ser  Ile Lys Val
    1415                 1420                 1425

Gln Ser  Ala Gly Met Thr Ser  Glu Val Val Glu Asp  Ser Thr Ile
```

```
    1430                1435                1440

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ile  Thr Thr Glu Ser Glu  Pro Leu Phe Gly
    1610                1615
```

REIVINDICACIONES

1. Un agente de unión a HPTPβ-ECD para su uso en la prevención de una enfermedad en el ojo de un sujeto, en el que el agente de unión a HPTPβ-ECD es un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ATCC No. PTA-7580 o una forma humanizada del mismo, en el que la enfermedad se previene mediante la reducción de la neovascularización y la enfermedad se selecciona entre retinopatía proliferativa y degeneración macular relacionada con la edad.

2. El agente de unión a HPTPβ-ECD para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la retinopatía proliferativa es la retinopatía proliferativa diabética.

3. El agente de unión a HPTPβ-ECD para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la retinopatía proliferativa se previene mediante la reducción de la neovascularización retiniana.

4. El agente de unión a HPTPβ-ECD para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la degeneración macular relacionada con la edad se evita mediante la reducción de la neovascularización coroidea.

5. El agente de unión a HPTPβ-ECD para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente de unión a HPTPβ-ECD está conjugado a un vehículo.

6. El agente de unión a HPTPβ-ECD para su uso según la reivindicación 5, en el que el vehículo es PEG.

7. El agente de unión a HPTPβ-ECD para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente de unión a HPTPβ-ECD es para la administración por inyección intraocular.

8. El agente de unión a HPTPβ-ECD para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente de unión a HPTPβ-ECD es para la administración por inyección subcutánea.

9. El agente de unión a HPTPβ-ECD para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente de unión a HPTPβ-ECD es para la administración por inyección intravenosa.

Fig. 1

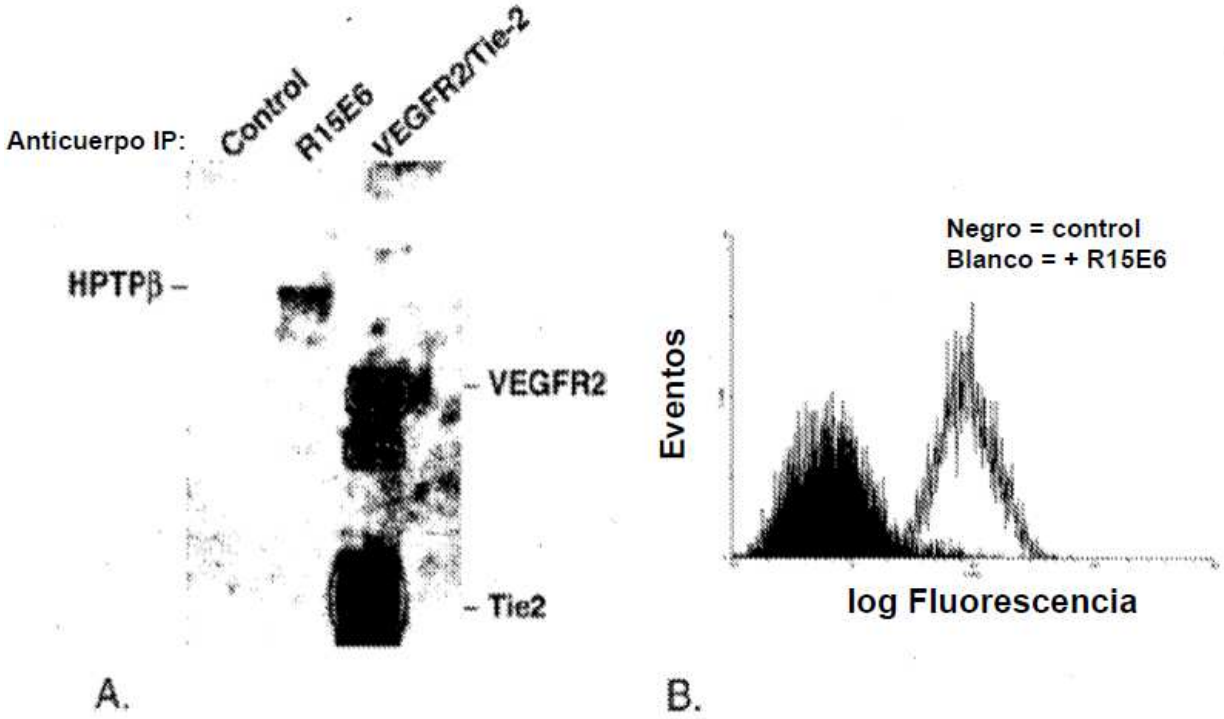

Anticuerpo IP:
Control
R15E6
VEGFR2/Tie-2
HPTPβ –
– VEGFR2
– Tie2
A.
Negro = control
Blanco = + R15E6
Eventos
log Fluorescencia
B.

Fig. 2

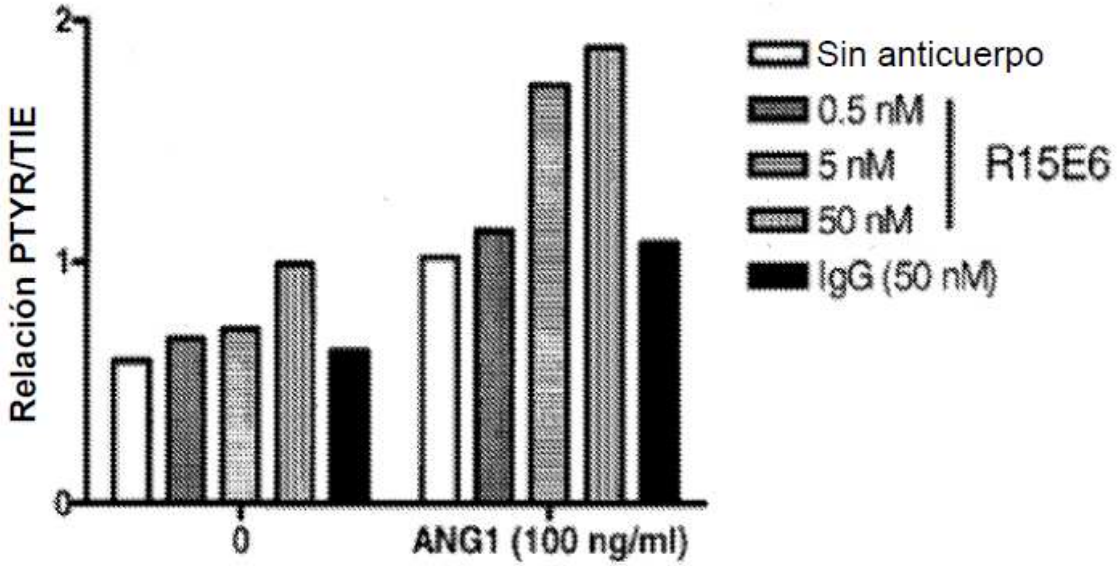

Relación PTYR/TIE
2
1
0
0
ANG1 (100 ng/ml)
Sin anticuerpo
0.5 nM
5 nM
50 nM
R15E6
IgG (50 nM)

Fig. 3

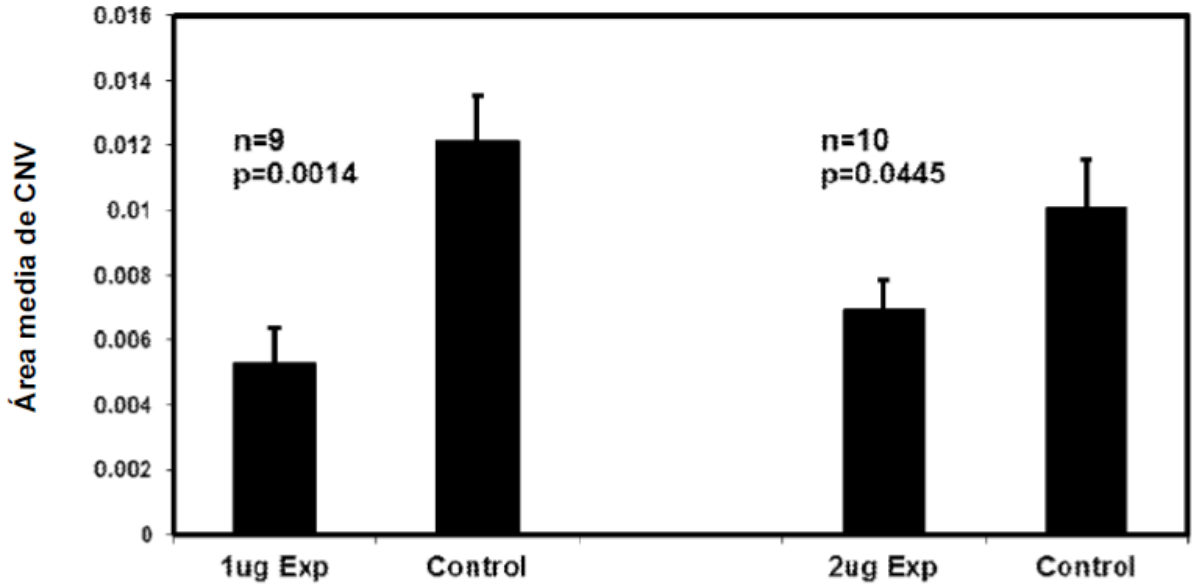

Área media de CNV
0.016
0.014
0.012
0.01
0.008
0.006
0.004
0.002
0
n=9
p=0.0014
n=10
p=0.0445
1ug Exp
Control
2ug Exp
Control

Fig. 4

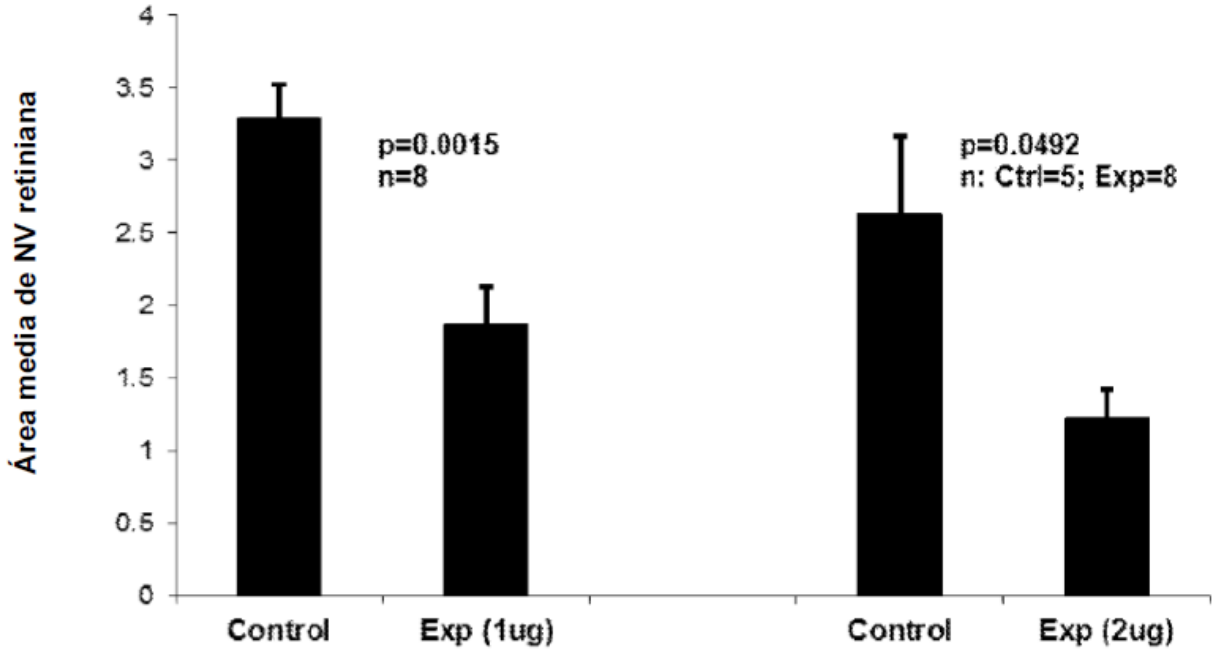

Área media de NV retiniana
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
p=0.0015
n=8
p=0.0492
n: Ctrl=5; Exp=8
Control
Exp (1ug)
Control
Exp (2ug)

Fig. 5

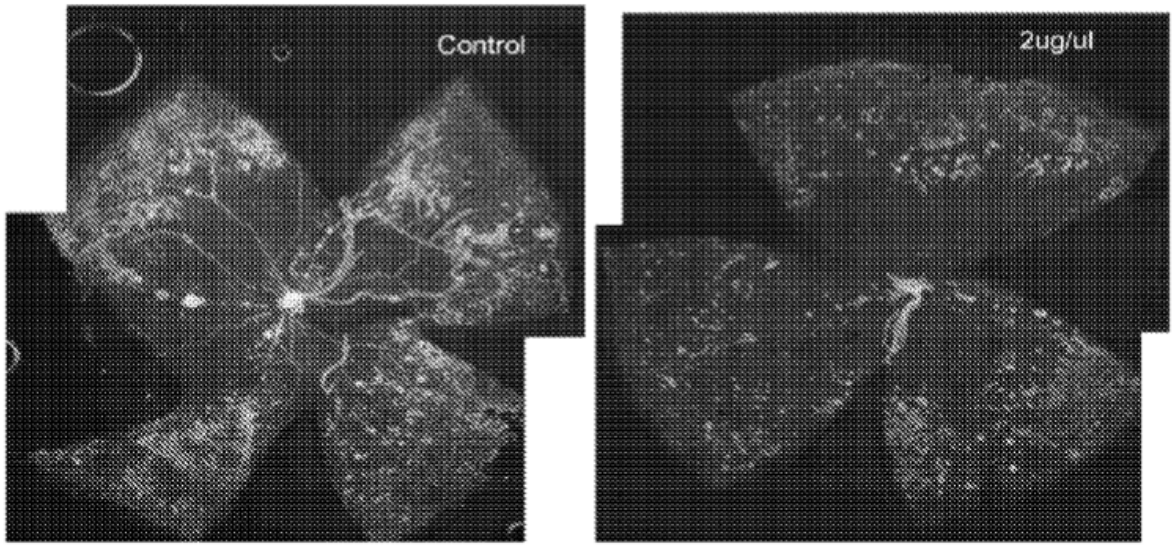


Fig. 6

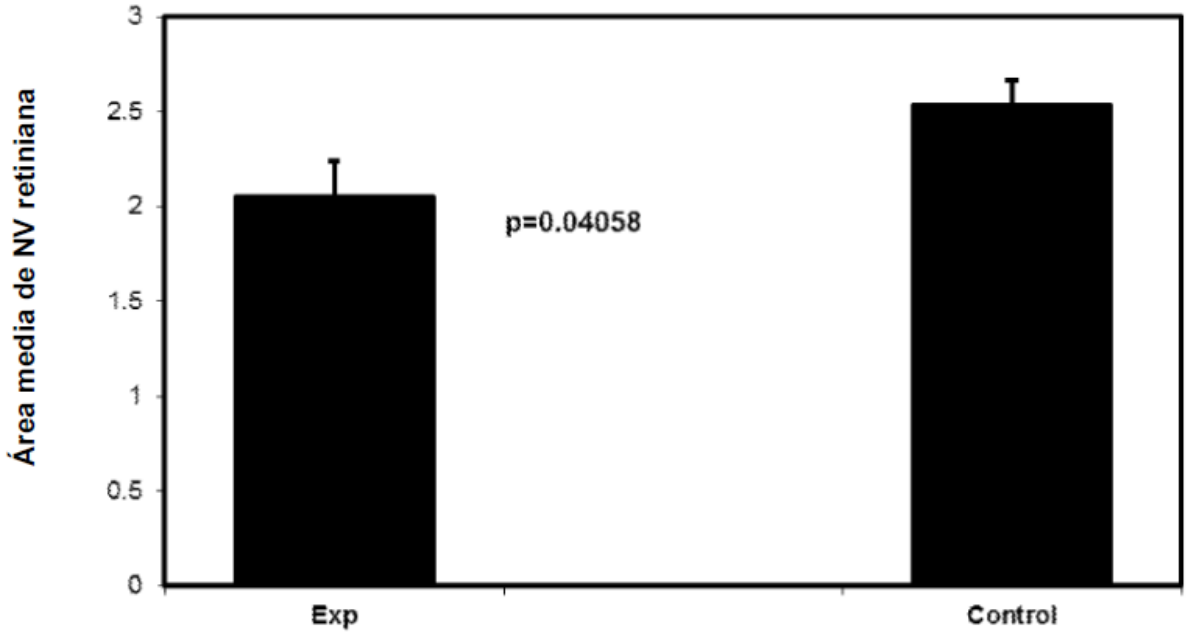
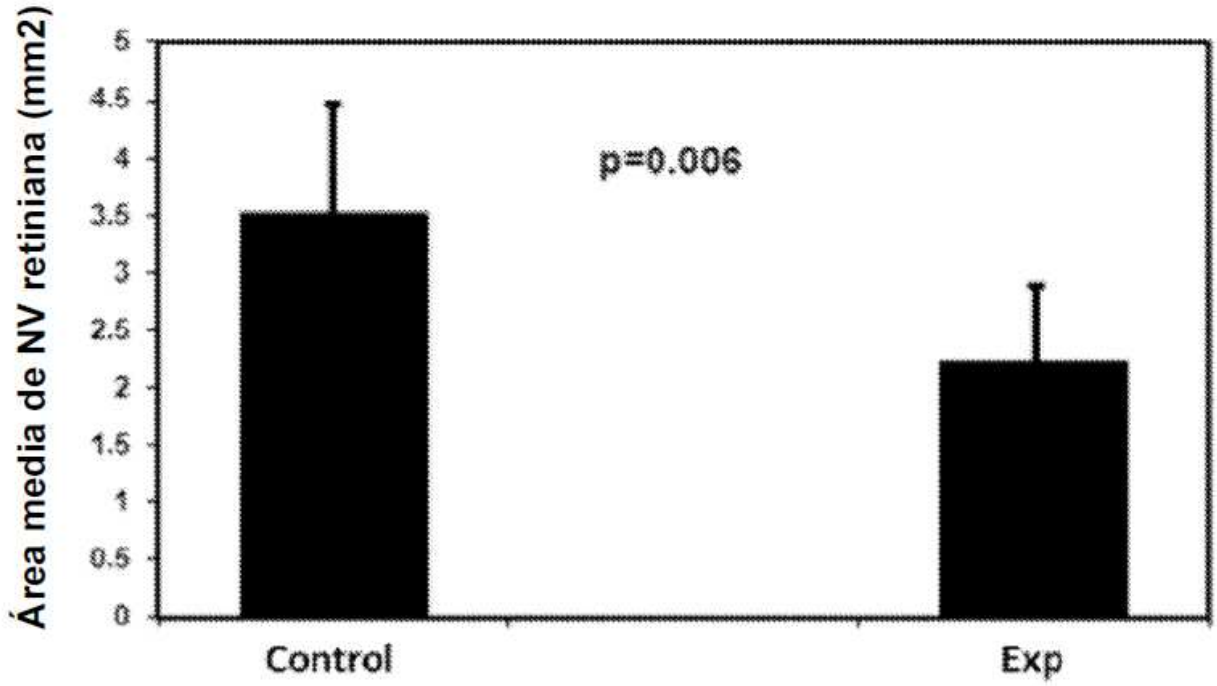


Fig. 7


Área media de NV retiniana (mm2)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
p=0.006
Control
Exp