

PCT

Industria y

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-001540-00000-0000

Fecha: 2011-01-07 11:11:38

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 262

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD

# PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

11-1540

54. TÍTULO

ANTAGONISTAS ESPECIFICOS DEL RECEPTOR FGF-R4

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SANOFI-AVENTIS

DOMICILIO

PARIS, FRANCIA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

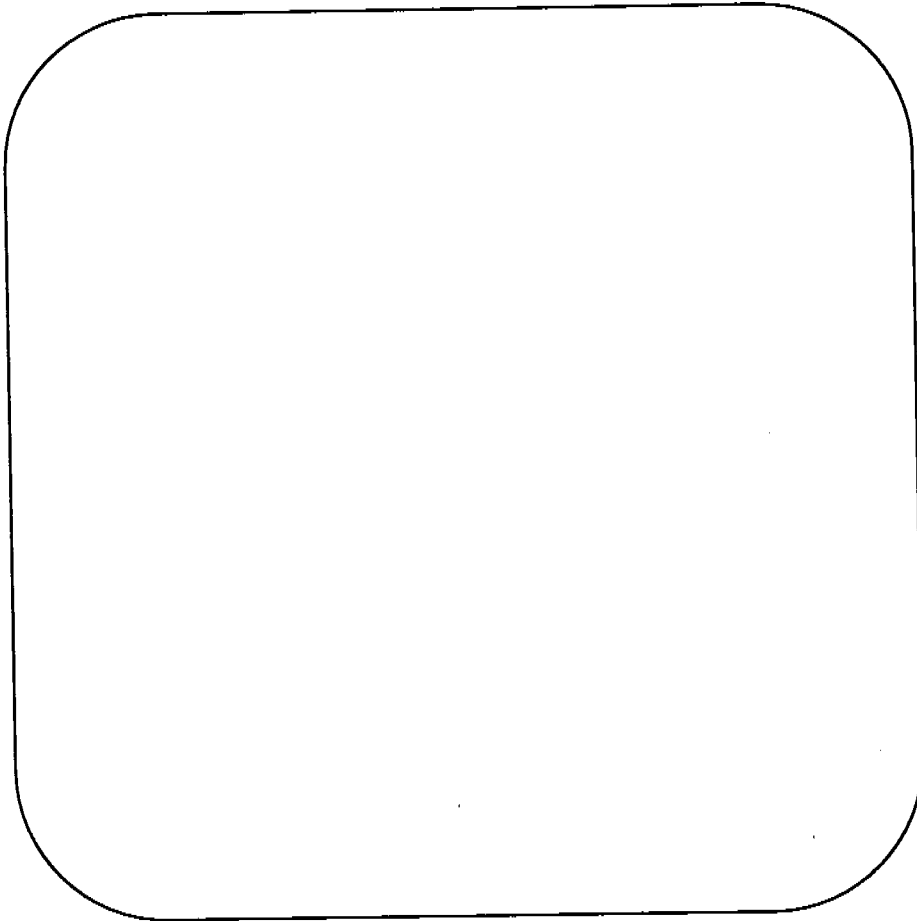
22. BOGOTÁ, D. C.,

08-02-2011

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                  |                                             |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------|
| 5  | <b>PCT (86)</b><br>Solicitud Internacional No. <u>PCT/FR2009/051343</u> Fecha: <u>7 de julio de 2009</u><br>Publicación Internacional No. <u>WO 2010/004204 A3</u> Fecha: <u>14 de enero de 2010</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                  |                                             |
| 6  | <b>Título (54)</b><br><u><b>ANTAGONISTAS ESPECÍFICOS DEL RECEPTOR FGF-R4</b></u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                  |                                             |
| 7  | <b>Clasificación Internacional (51)</b> <u>C07K 016/028</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                  |                                             |
| 8  | <b>Prioridad</b><br>SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | (33) País de Origen<br><u>FR</u> | (32) Fecha<br><u>8 de julio de 2008</u>     |
|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                  | (31) Número de Solicitud<br><u>08/03888</u> |
| 9  | Comprobante de pago No.: <u>11- 135</u> Fecha: <u>3 de enero de 2011</u><br>Comprobante de pago No.: <u>11- 371</u> Fecha: <u>3 de enero de 2011</u><br>Comprobante de pago No.: <u>11- 372</u> Fecha: <u>3 de enero de 2011</u><br>Comprobante de pago No.: <u>11- 441</u> Fecha: <u>3 de enero de 2011</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                  |                                             |
| 10 | <b>Anexos:</b><br><input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.oo.<br><input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago por 22 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$594.000.oo.<br><input checked="" type="checkbox"/> Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.<br><input checked="" type="checkbox"/> Poderes, si fuere el caso.<br><input type="checkbox"/> Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.<br><input type="checkbox"/> Declaraciones.<br><input checked="" type="checkbox"/> Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)<br><input checked="" type="checkbox"/> Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)<br><input type="checkbox"/> Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.<br><input type="checkbox"/> Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, copia del contrato de acceso.<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.<br><input type="checkbox"/> Arte final 12x12<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.<br><input checked="" type="checkbox"/> Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS |                                  |                                             |

11

## FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA:

Luz Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

**DOCUMENTOS ANEXOS**

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/004204 A3

Descripción:

Páginas 56 en el idioma original

Páginas 51 en español

Reivindicaciones: Número (s) 32

Figuras: Número (s) 16

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA  
FASE INTERNACIONAL**

**Notaria  
Sexta**

**6**

**DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.**

**COPIA NUMERO 23**

**DE LA ESCRITURA NUMERO: 3870**  
**FECHA: 26/Julio/2010**

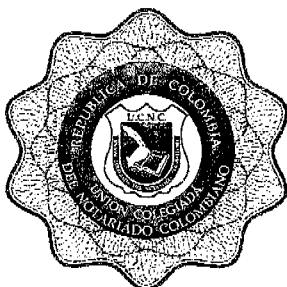
**ACTO O CONTRATO:**  
**PODER ESPECIAL**  
**OTORGANTES:**  
**CAVELIER ABOGADOS**  
**LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**



**AMPARO QUINTERO ARTURO**

**NOTARIA SEXTA**

**CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41**  
**Correo Electrónico: [notaria6debgta@etb.net.co](mailto:notaria6debgta@etb.net.co)**



**ESCRITURA PUBLICA NUMERO** 3.870 - - - -  
**TRES MIL OCHOCIENTOS SETENTA** - - - - -  
**DE FECHA:** JULIO VEINTISEIS (26) - - - - -  
**DE DOS MIL DIEZ (2010)** - - - - -  
**OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6ª.) DEL**  
**CÍRCULO NOTARIAL DE BOGOTÁ, D.C.** -----

**ACTO: PODER** -----

**PODERDANTE: CAVELIER ABOGADOS** Nit. 860.041.367-3 ✓

**APODERADOS:** -----

|                                      |                        |
|--------------------------------------|------------------------|
| <b>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</b>         | <b>C.C. 35.456.344</b> |
| <b>NIDIA OSORIO LOPEZ</b>            | <b>C.C. 39.787.682</b> |
| <b>OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA</b> | <b>C.C. 79.524.634</b> |
| <b>EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY</b> | <b>C.C. 52.006.265</b> |
| <b>JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL</b>    | <b>C.C. 16.209.380</b> |

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, ante mí **AMPARO**  
**QUINTERO ARTURO** - - Notaria(o) Sexta(o) (6) - - - - - de este Círculo  
Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes  
términos: -----

Compareció: con minuta escrita la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO**, mayor  
de edad, vecina de esta ciudad, casada, identificada con la cédula de ciudadanía  
No. 51.680.061 de Bogotá, y dijo: -----

**ESTIPULACIONES** -----

**PRIMERA:** Que obra en su calidad de Representante Legal de la sociedad  
denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35,  
Bogotá, Colombia. -----

**SEGUNDA:** Que **SANOFI-AVENTIS**, sociedad constituida y existente bajo las  
leyes de Francia, domiciliada en 174 Avenue de France, 75013 Paris, Francia,  
designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad  
Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en  
la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. -----

**TERCERA:** Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER**  
**ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **SANOFI-AVENTIS**,  
confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555,  
identificada con cédula de ciudadanía número **35.456.344** de Usaquen, **NIDIA**



**OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de ciudadanía número **39.787.682** de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número **79.524.634** de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número **52.006.265** de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número **16.209.380** de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: -----

a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos -----

b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. -----

**CUARTO:** Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. -----

**QUINTO:** Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día **28 de Mayo de 2010** por **SANOFI-**



\*01\*



\* 9 4 7 1 9 8 3 7 \*

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

12 DE JULIO DE 2010 HORA 16:09:43

R028844095

PAGINA: 1 de 3

\*\*\*\*\*

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS  
N.I.T. : 860041367-3  
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO ( CUNDINAMARCA )..

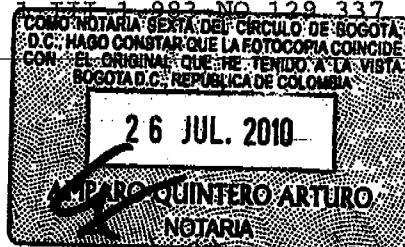
CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

| ESCRITURAS NO. | FECHA       | NOTARIA  | INSCRIPCION             |
|----------------|-------------|----------|-------------------------|
| 842            | 10-V-1.977  | 18. BTA. | 27-V-1.977-NO. 46.204   |
| 3.430          | 1-VII-1.980 | 6A. BTA. | 3-IX-1.980-NO. 89.582   |
| 4.844          | 10-IX-1.980 | 6A. BTA. | 8-X-1.980-NO. 91.261    |
| 432            | 10-II-1.983 | 6A. BTA. | 1-III-1.983-NO. 129.337 |



|            |               |                 |                   |         |
|------------|---------------|-----------------|-------------------|---------|
| 7.710      | 10-X-1.984    | 6A. BTA.        | 15-XI-1.984-NO.   | 1.559   |
| 7.305      | 21-X-1.985    | 6A. BTA.        | 18-XI-1.985-NO.   | 1.906   |
| 2.567      | 29-IV-1.987   | 6A. BTA.        | 7-V- 1.987-NO.    | 2.386   |
| 4.278      | 3-VII-1.987   | 6A. BTA.        | 23-VII-1987 NO.   | 215.652 |
| 2.657      | 25- IV-1.988  | 6A. BTA.        | 19- V -1988-NO.   | 2,740   |
| 9.033      | 21-XII-1.990  | 6A. BTA.        | 10- I - 1991-NO.  | 3.786   |
| 25         | 3- I -1.991   | 6A. BTA.        | 10- I - 1991-NO.  | 3.787   |
| 1.608      | 8-III-1.991   | 6A. BTA.        | 14-III- 1991-NO.  | 3.841   |
| 2.155      | 2-IV- 1.991   | 6A. BTA.        | 8-IV - 1991-NO.   | 3.862   |
| 797        | 7-II -1.991   | 6A. BTA.        | 7- V -1991-NO.    | 3.882   |
| 1.739      | 14-III-1.991  | 6A. BTA.        | 7- V -1991-NO.    | 3.881   |
| 5.886      | 21-VIII-1.991 | 6A. BTA.        | 27-VIII-1991 NO.  | 4.019   |
| 8.596      | 4-XII -1.991  | 6A. BTA.        | 16-III -1992 NO.  | 4.430   |
| 1.494      | 10-III -1.992 | 6A. BTA.        | 19-III -1992 NO.  | 4.436   |
| 4.205      | 8 -VII -1.992 | 6A. BTA.        | 15-VII -1992 NO.  | 4.554   |
| 8.829      | 16-XII -1.992 | 6A. BTA.        | 24-XII -1992 NO.  | 4.819   |
| 12         | 5-I -1.993    | 6 STAFE BTA     | 13-I -1993 NO.    | 4.850   |
| 4.877      | 29-VI -1.993  | 6 STAFE BTA     | 7-VII -1993 NO.   | 5.065   |
| 5.216      | 12-VII -1.993 | 6 STAFE BTA     | 16-VII -1993 NO.  | 5.077   |
| ACTA NO.71 | 2-IX- 1.993   | JUNTA DE SOCIOS | 29-IX- 1993 NO.   | 5.174   |
| 2.034      | 18-IV- 1.995  | 6 STAFE BTA     | 27- IV -1995 NO.  | 5.937   |
| 2.227      | 25-IV-1.995   | 6 STAFE BTA     | 18-VIII-1.995 NO. | 6.092   |
| 7.594      | 12-XII-1.995  | 6 STAFE BTA     | 19- XII-1.995 NO. | 6.294   |
| 676        | 11- II-1.997  | 6 STAFE BTA     | 14- II -1.997 NO. | 6.873   |

# REFORMAS:

| E.P. NO. | FECHA      | NOTARIA | CIUDAD      | FECHA      | NO. INSC. |
|----------|------------|---------|-------------|------------|-----------|
| 0004506  | 1997/07/28 | 0006    | BOGOTA D.C. | 1997/09/02 | 00007115  |
| 0002103  | 1998/04/08 | 0006    | BOGOTA D.C. | 1998/04/21 | 00007426  |
| 0005326  | 1998/08/06 | 0006    | BOGOTA D.C. | 1998/08/13 | 00007544  |
| 0005538  | 1998/08/14 | 0006    | BOGOTA D.C. | 1998/08/27 | 00007564  |
| 0007760  | 1998/11/10 | 0006    | BOGOTA D.C. | 1998/11/12 | 00007644  |
| 0006709  | 1997/11/04 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2000/12/04 | 00008481  |
| 0003034  | 2003/05/30 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2003/06/04 | 00882729  |
| 0003786  | 2004/07/16 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2004/07/28 | 00009703  |
| 0001432  | 2005/03/18 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2005/04/07 | 00009917  |
| 0004818  | 2005/08/22 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2005/08/26 | 00010008  |
| 0005506  | 2007/07/17 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2007/07/24 | 00010841  |
| 5453     | 2009/10/19 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2009/10/21 | 00012243  |
| 1336     | 2010/03/16 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2010/03/24 | 00012506  |

# CERTIFICA:

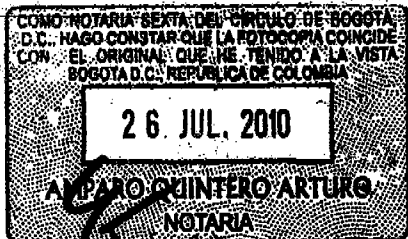
VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

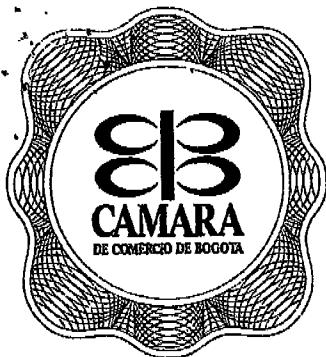
# CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

# CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :  
- SOCIO CAPITALISTA (S)





\*01\*



\* 9 4 7 1 9 8 3 8 \*

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

12 DE JULIO DE 2010

HORA 16:09:43

R028844095

PAGINA: 2 de 3

\*\*\*\*\*

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO

N.I.T. 000008001722568

NO. CUOTAS: 8,800.00

VALOR: \$8,800.00

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

C.E. 000000000131100

NO. CUOTAS: 1,200.00

VALOR: \$1,200.00

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

C.C. 000000035456344

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

CHAVARRO JORGE

C.C. 000000016209380

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

TOTALES

NO. CUOTAS: 10,000.00

VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS ( 1200 ) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO,

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

\*\* NOMBRAMIENTOS \*\*

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

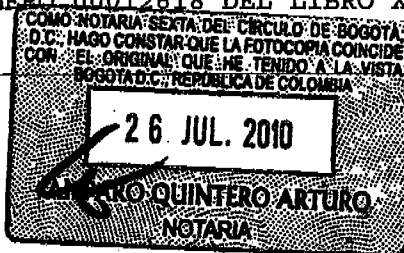
IDENTIFICACION

PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO

CAVELIER GAVIRIA GERMAN

C.C. 000000002877924

QUE POR ACTA NO. 26 DE ASAMBLEA GENERAL DEL 13 DE MAYO DE 2010, INSCRITA EL 24 DE MAYO DE 2010 BAJO EL NUMERO 00012618 DEL LIBRO XIII,



FUE (RON) NOMBRADO (S):

| NOMBRE                             | IDENTIFICACION         |
|------------------------------------|------------------------|
| DIRECTORA                          |                        |
| ZAPATA GIRALDO ADRIANA             | C.C. 000000051680061   |
| REPRESENTANTE LEGAL                |                        |
| ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO    | N.I.T. 000008001722568 |
| REPRESENTANTE LEGAL                |                        |
| GALLON GIRALDO CARLOS              | C.C. 000000019066425   |
| REPRESENTANTE LEGAL                |                        |
| GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE | C.E. 000000000131100   |
| SOCIO COLECTIVO                    |                        |
| GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE | C.E. 000000000131100   |
| SOCIO COLECTIVO                    |                        |
| ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO    | N.I.T. 000008001722568 |

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

| NOMBRE                                     | IDENTIFICACION       |
|--------------------------------------------|----------------------|
| SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO |                      |
| GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE         | C.E. 000000000131100 |

CERTIFICA:

QUE EL NOMBRAMIENTO DE GALLÓN GIRALDO CARLOS INSCRITO BAJO EL REGISTRO 00012618 DEL LIBRO XIII, SE DA EN SU CONDICIÓN DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO.

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA ( 180 ) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

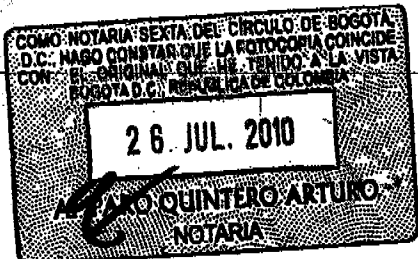
\*\* REVISOR FISCAL \*\*

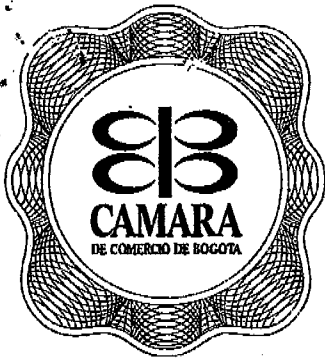
QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

| NOMBRE                        | IDENTIFICACION       |
|-------------------------------|----------------------|
| REVISOR FISCAL                |                      |
| RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO | C.C. 000000002877024 |

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.





\*01\*



\* 9 4 7 1 9 8 3 9 \*

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

12 DE JULIO DE 2010

HORA 16:09:43

R028844095

PAGINA: 3 de 3

\*\*\*\*\*

\*\*\* EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE  
\*\*\* FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO \*\*\*

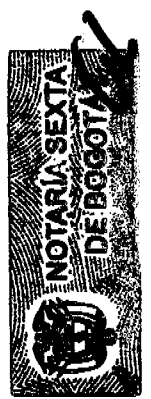
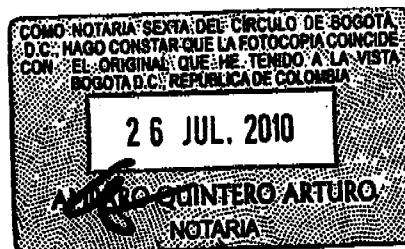
SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE 75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

RECUERDE INGRESAR A [www.supersociedades.gov.co](http://www.supersociedades.gov.co) PARA VERIFICAR SI SU EMPRESA ESTA OBLIGADA A REMITIR ESTADOS FINANCIEROS. EVITE SANCIONES.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,  
VALOR : \$ 3,600

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

*Esteban D.*



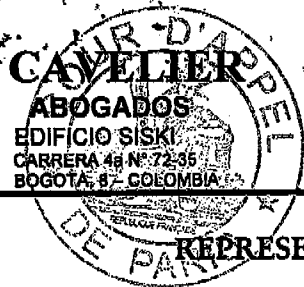
\* \* \*

NO ES VALIDO POR ESTA CARA

\* \* \*



3



## REPRESENTACION

## REPRÉSENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/Je (nous) soussigné(s)

**SANOFI-AVENTIS**

domiciliado (s)

domicilié(s) à 174 Avenue de France, 75013 PARIS, FRANCE

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a No. 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

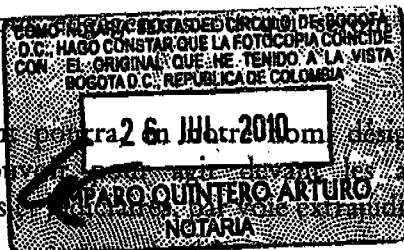
CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y

Par le présent instrument, procède (procédons) à la désignation de CAVELIER ABOGADOS, une société collective constituée conformément aux lois de la République de Colombie selon l'acte No. 6233 déposé le 10 septembre 1974 au rang des minutes à l'étude de notaire six de l'arrondissement notarial de Bogota, sise à Bogota D.C., titulaire de l'immatriculation commerciale No. 00820237 et du matricule fiscal 860041367-3, sise Carrera 4 No. 72 - 35, Bogota, Colombie, comme notre représentant pour toutes les affaires de Propriété Industrielle, ayant la faculté de recevoir des notifications et de nommer les fonds des pouvoirs judiciaires ou extrajudiciaires.

CAVELIER ABOGADOS pourra également nous représenter, avec les mêmes facultés ci-dessus indiquées, devant toute entité ou toute personne, ayant ou non juridiction, toute administration ou toute autorité juridictionnelle, tout tribunal d'arbitrage, dans des affaires de nature civile, commerciale, pénale, constitutionnelle, de concurrence, de concurrence déloyale, administrative, contentieuse-administrative, de protection du consommateur, de variétés végétales, de noms de domaine, d'oppositions ou d'observations, de radiations administratives et judiciaires, de nullité, de mesures conservatoires, de concession de licences, d'actions de protection juridique des droits constitutionnels, de protection de secrets industriels, de droit réglementaire et en général pour qu'il me(nous) représente dans toutes les actions ou dans tous les procès que nous pourrions être engagés contre nous.

Le représentant pourra, en notre nom, désigner des fondés de pouvoir pour agir devant les autorités administratives et judiciales, par voie extrajudiciaire et





COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA  
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE  
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA  
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

26 JUL. 2010

AMARO QUINTERO ARTURO  
NOTARIA

91

proveniente de hechos anteriores, como

igualmente en los procesos en mi nombre, en tanto que

demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

demandeurs, défendeurs, cointéressés, agents officieux, tiers, pour appel en garantie ou comme intervenants ad excludendum. Dans le cadre de cette autorisation, le représentant pourra autoriser les fondés de pouvoir qu'il désignera à transiger, concilier, admettre les faits du procès, désister, radier, recevoir, renoncer et substituer le pouvoir qui lui sera octroyé. De même, le représentant aura la faculté de révoquer le pouvoir ainsi octroyé au moment où il jugera opportun. Le représentant pourra en tout cas ratifier les actes d'agents officieux.

Dado y firmado hoy/Fait et signé  
aujourd'hui le  
en/à Paris

28 Mai 2010

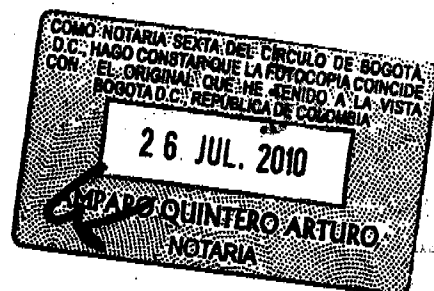
por/par

Firma/Signature

Josiane MERLIER  
Directeur, Administration Brevets

Je soussigné Me **Hervé POMMERY**  
Notaire à Paris, certifie matériellement  
la signature de Madame **Josiane MERLIER**.

apposée sur le présent document.  
Cette certification ne comporte aucune  
vérification de l'exactitude des faits et  
actes mentionnés dans le présent document



(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

Le présent acte, public,

3. agissant en qualité de... **Notaire**.....

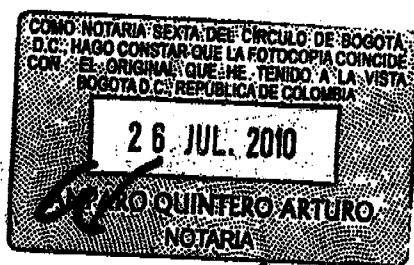
.....

**5. à Paris.**

7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

9. Sceau : John MARTIN

**"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou l'empreinte sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"**



TRADUCCION OFICIAL NO. 517/2010

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCES; LLEVA SELLO Y FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCION No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.

TRADUCCIÓN DE LOS SELLOS QUE SE ENCUENTRAN EN EL DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN OTORGADO POR **SANOFI-AVENTIS**, DOMICILIADA EN 174 AVENUE DE FRANCE, 75013 PARIS, FRANCE, A **CAVELIER ABOGADOS**

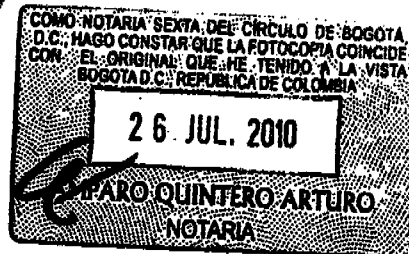
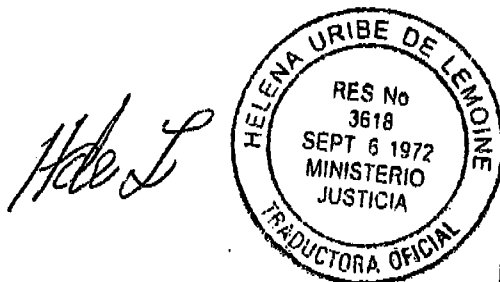
DADO Y FIRMADO EL 28 DE MAYO DE 2010 /

POR: **JOSIANE MERLIER**, DIRECTOR ADMINISTRACIÓN DE PATENTES

EL SUSCRITO ABOGADO **HERVE POMMERY**, NOTARIO DE PARIS, CERTIFICA MATERIALMENTE LA FIRMA DE LA SEÑORA **JOSIANE MERLIER**, PUESTA EN EL PRESENTE DOCUMENTO. ESTA CERTIFICACIÓN NO CONLLEVA NINGUNA VERIFICACIÓN ACERCA DE LA EXACTITUD DE LOS HECHOS Y ACTOS MENCIONADOS EN EL PRESENTE DOCUMENTO.

FIRMADO: **HERVE POMMERY**, NOTARIO ASOCIADO DE PARIS.

HAY SELLO DEL NOTARIO.



ESPACIO

EN

BLANCO

000000  
000000  
000000

**APOSTILLA**

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961 /

1. PAÍS: REPÚBLICA FRANCESA

**EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO**

2. HA SIDO FIRMADO POR: EL ABOGADO HERVE POMMERY
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO
4. LLEVA EL SELLO DE: SU DESPACHO

**CERTIFICADO**

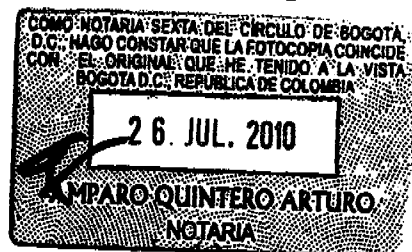
5. EN: PARÍS
6. EL: 8 DE JUNIO DE 2010
7. POR: EL PROCURADOR GENERAL DE LA CORTE DE APELACIONES DE PARÍS
8. BAJO EL NO: 40356
9. SELLO: CORTE DE APELACIONES DE PARÍS
10. FIRMADO: JEAN MARTIN, ABOGADO GENERAL

La Apostilla confirma únicamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla del documento. No implica que el contenido del documento sea verdadero ni que la República Francesa apruebe su contenido.

LA TRADUCTORA OFICIAL

*Helena Uribe de Lemoine*

HELENA URIBE DE LEMOINE



SECRETARIA DE  
RELACIONES EXTERIORES

025547  
Helena Uribe  
Cuya Fianza aparece en el  
DOCUMENTO DESEMPENA  
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES

2010 JUL 27 P 1:00  
JEFE DE LEGALIZACIONES  
BOGOTA D.C.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA  
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE  
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA  
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA  
26 JUL. 2010  
ARTURO QUINTERO ARTURO  
NOTARIA

0001/3



**ATTESTATION NOTARIEE**  
Je soussigné, Maître Hervé POMMERY,  
notaire :  
**CERTIFIE :**

Que la signature qui précède de  
Mme Josiane MERLIER est  
authentique

Que la signataire exerce actuellement la  
fonction de

**Directeur, Administration Brevets**

de la société

**SANOFI AVENTIS**

Société légalement constituée et existant  
selon les lois de France

Domiciliée à

**174 Avenue de France  
75013 PARIS, (France)**

Et que la signataire est dûment autorisée à  
concéder le présent document.

Fait et signé à **PARIS**

Le **7 juin 2010**

Signature : **Hervé POMMERY**  
NOTAIRE

**CERTIFICACIÓN NOTARIAL**

El infrascrito, Maître Hervé POMMERY,  
Notario :

**CERTIFICA :**

Que la Firma que antecede de  
Sra. Josiane MERLIER es auténtica

Que el signatario desempeña actualmente  
el cargo de

**Directeur, Administration Brevets**

de la compañía

**SANOFI AVENTIS**

Sociedad que actualmente existe y está  
organizada de acuerdo a las leyes de  
FRANCIA

Que la dirección de dicha compañía es

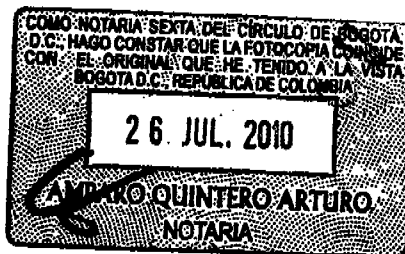
**174 Avenue de France  
75013 PARIS, (Francia)**

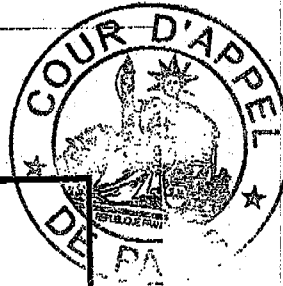
Y que el signatario tiene facultad para  
otorgar este documento.

Dado y firmado en **PARIS**

El **7 junio de 2010**

Firma : **Hervé POMMERY**  
NOTAIRE





**APOSTILLE**  
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par. M. POMMERY

3. agissant en qualité de. Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de. Son étude

Attesté

5. à Paris

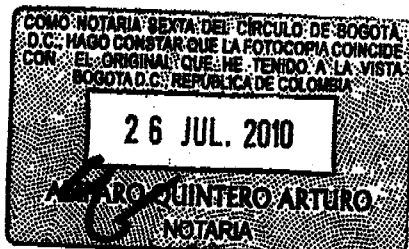
6. le. 08 JUIN 2010

7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° 40355

9. Sceau : Jean MARTIN  
"AVOCAT GÉNÉRAL"

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"



**AUTENTICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)**

EL INFRASCRITO ABOGADO HERVE POMMERY, NOTARIO:, CERTIFICA QUE LA FIRMA QUE ANTECEDE DE LA SEÑORA JOSIANE MERLIER ES AUTENTICA; QUE EL SIGNATARIO DESEMPEÑA ACTUALMENTE EL CARGO DE **DIRECTOR, ADMINISTRACIÓN DE PATENTES**, DE LA SOCIEDAD **SANOFI AVENTIS**, SOCIEDAD QUE ACTUALMENTE EXISTE Y ESTA ORGANIZADA DE ACUERDO A LAS LEYES DE FRANCIA, QUE LA DIRECCION DE DICHA COMPAÑÍA ES 174 AVENUE DE FRANCE, 75013 PARIS, (FRANCIA) Y QUE EL SIGNATARIO TIENE FACULTAD PARA OTORGAR ESTE DOCUMENTO.

DADO Y FIRMADO: EN PARIS EL 7 DE JUNIO DE 2010

FIRMADO: HERVE POMMERY, NOTARIO DE PARIS

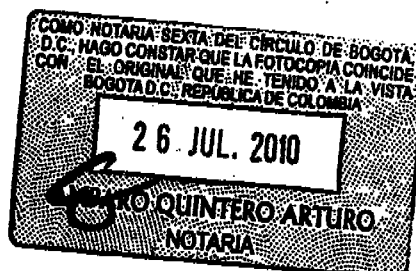
HAY SELLO DEL NOTARIO

---

*Heve*



3



ESPACIO

EN

BLANCO

## APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

2. PAÍS: REPÚBLICA FRANCESA

### EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: EL ABOGADO HERVE POMMERY
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO
4. LLEVA EL SELLO DE: SU DESPACHO

### CERTIFICADO

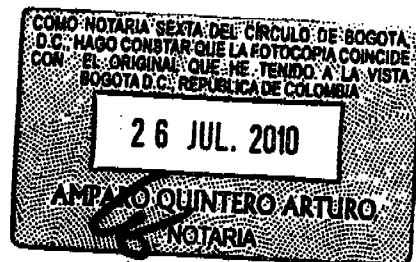
5. EN: PARÍS
6. EL: 8 DE JUNIO DE 2010
7. POR: EL PROCURADOR GENERAL DE LA CORTE DE APELACIONES DE PARIS
8. BAJO EL NO: 40355
9. SELLO: CORTE DE APELACIONES DE PARIS
10. FIRMADO: JEAN MARTIN, ABOGADO GENERAL

La Apostilla confirma únicamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla del documento. No implica que el contenido del documento sea verdadero ni que la República Francesa apruebe su contenido.

LA TRADUCTORA OFICIAL

*Helena Uribe de Lemoine*

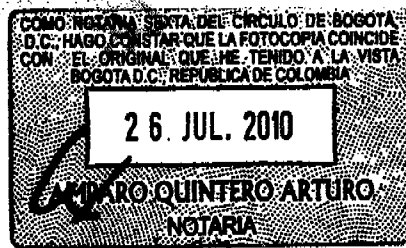
HELENA URIBE DE LEMOINE



MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES

2010 JUL 21 P 1:00

JEFE DE LEGALIZACIONES  
BOGOTA D.C.



025549  
Helena Uribe  
CUYA FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPENA  
AS FUNCIONES INDICADAS



AVENTIS, documento que está debidamente legalizado. --  
Presente la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO**  
domiciliada en Bogotá, identificada como aparece al pie de  
su firma y manifestó que está conforme con el contenido  
de esta escritura pública. -----

----- **HASTA AQUI LAS DECLARACIONES DEL INTERESADO** -----

**OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN.** Leído, el presente instrumento público por  
el otorgante, dio su asentimiento y en prueba de ello lo firma junto con la suscrita  
Notaria quien en esta forma lo autoriza. -----

**DERECHOS NOTARIALES:** \$ 42.860.00 -----

**IVA:** \$ 14.732.00 -----

**RECAUDO SUPERINTENDENCIA:** \$3.570.00 -----

**RECAUDO FONDO NACIONAL DE NOTARIADO:** \$3.570.00 -----

**RESOLUCIÓN 10301 DE DICIEMBRE 17 DE 2009** -----

**PAPEL NOTARIAL:** El presente instrumento público se extendió y firmó en las  
hojas de papel notarial números: 7-700044-126454 7-700044-125990

**EN BLANCO... EN BLANCO**

  
**ADRIANA ZAPATA GIRALDO**

C.C. 51680061

TEL. 2110348

Representante Legal de **CAVELIER ABOGADOS**



**AMPARO QUINTERO**  
**NOTARIA(O) SEXTA(O) (6) DE BOGOTÁ, D.C.**

T. CAVELIER.Angelica.PE



ES FIEL Y 23AVA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERLO 3870 DE FECHA 26 DE JULIO DE 2010.

COPIA QUE EXPIDO EN 12 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTA, D.C. 03 DE ENERO DE 2011

RESOLUCION 01 DE 2008

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.



AMPARO QUINTARO ARTURO  
NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 janvier 2010 (14.01.2010)

(10) Numéro de publication internationale

WO 2010/004204 A3

PCT

(51) Classification internationale des brevets :  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
C12N 5/18 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2009/051343

(22) Date de dépôt international :  
7 juillet 2009 (07.07.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
08/03888 8 juillet 2008 (08.07.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
SANOFI-AVENTIS [FR/FR]; 174 avenue de France,  
F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BAURIN,  
Nicolas [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département  
Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR).  
BERNE, Pierre-François [FR/FR]; c/o sanofi-aventis,  
Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013  
Paris (FR). BLANCHE, Francis [FR/FR]; c/o sanofi-  
aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France,  
F-75013 Paris (FR). BONO, Françoise [FR/FR]; c/o  
sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de  
France, F-75013 Paris (FR). CAMERON, Béatrice [FR/  
FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174  
Avenue de France, F-75013 Paris (FR). DABDOUBI,  
Tarik [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets,  
174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). HERBERT,  
Corentin [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département  
Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR).  
MIKOL, Vincent [FR/FR]; c/o sanofi-aventis,  
Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013  
Paris (FR). REMY, Elisabeth [FR/FR]; c/o sanofi-

aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France,  
F-75013 Paris (FR).

(74) Mandataire : MARTIN-TOUAUX, Elsa; c/o sanofi-  
aventis, Département Brevets, 174 avenue de France,  
F-75013 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,  
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,  
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,  
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,  
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des  
séquences (règle 5.2.a))

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale :

29 avril 2010

(54) Title : FGF-R4 RECEPTOR-SPECIFIC ANTAGONISTS

(54) Titre : ANTAGONISTES SPECIFIQUES DU RECEPTEUR FGF-R4

(57) Abstract : The present invention relates to FGF-R4 receptor-specific antagonist molecules enabling the inhibition of the activity of said receptor. Said antagonists are, particularly, FGF-R4-specific antibodies enabling the inhibition of the activity of said receptor. The present invention also relates to the therapeutic use of said antibodies, particularly in the field of angiogenesis and in the treatment of certain types of cancer.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet des molécules antagonistes spécifiques du récepteur FGF-R4 permettant d'inhiber l'activité de ce récepteur. Ces antagonistes sont en particulier des anticorps dirigés spécifiquement contre le récepteur FGF-R4 permettant d'inhiber l'activité de ce récepteur. La présente invention a également pour objet l'utilisation thérapeutique de ces anticorps, en particulier dans le domaine de l'angiogenèse, et dans le traitement de certains types de cancer.

WO 2010/004204 A3

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 janvier 2010 (14.01.2010)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2010/004204 A2**

(51) Classification internationale des brevets :  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
C12N 5/18 (2006.01)

Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). REMY, Elisabeth [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2009/051343

(74) Mandataire : MARTIN-TOUAUX, Elsa; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :  
7 juillet 2009 (07.07.2009)

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
08/03888 8 juillet 2008 (08.07.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
SANOFI-AVENTIS [FR/FR]; 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BAURIN, Nicolas [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). BERNE, Pierre-François [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). BLANCHE, Francis [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). BONO, Françoise [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). CAMERON, Béatrice [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). DABDOUBI, Tarik [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). HERBERT, Corentin [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). MIKOL, Vincent [FR/FR]; c/o sanofi-aventis,

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : FGF-R4 RECEPTOR-SPECIFIC ANTAGONISTS

(54) Titre : ANTAGONISTES SPECIFIQUES DU RECEPTEUR FGF-R4

(57) Abstract : The present invention relates to FGF-R4 receptor-specific antagonist molecules enabling the inhibition of the activity of said receptor. Said antagonists are, particularly, FGF-R4-specific antibodies enabling the inhibition of the activity of said receptor. The present invention also relates to the therapeutic use of said antibodies, particularly in the field of angiogenesis and in the treatment of certain types of cancer.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet des molécules antagonistes spécifiques du récepteur FGF-R4 permettant d'inhiber l'activité de ce récepteur. Ces antagonistes sont en particulier des anticorps dirigés spécifiquement contre le récepteur FGF-R4 permettant d'inhiber l'activité de ce récepteur. La présente invention a également pour objet l'utilisation thérapeutique de ces anticorps, en particulier dans le domaine de l'angiogenèse, et dans le traitement de certains types de cancer.

WO 2010/004204 A2

(9)

### Antagonistes spécifiques du récepteur FGF-R4

La présente invention a pour objet des antagonistes spécifiques du récepteur 4 aux FGF (FGF-R4) permettant d'inhiber l'activité de ce récepteur. Ces antagonistes sont en particulier des anticorps dirigés spécifiquement contre le récepteur 4 aux FGF (FGF-R4).

- 5 La présente invention a également pour objet l'utilisation thérapeutique de ces antagonistes, en particulier dans le domaine de l'angiogenèse et dans le traitement de certains types de cancer.

- 10 Les FGF (Fibroblast Growth Factor) comptent parmi les premières molécules décrites comme étant capables de stimuler la prolifération, la migration et la différenciation des cellules vasculaires *in vitro* et *in vivo*. Une littérature abondante décrit l'induction de l'angiogenèse et la formation de capillaires sanguins *in vitro* et *in vivo* par les FGF. Les FGF sont également impliqués dans l'angiogenèse tumorale en promouvant la formation de vaisseaux sanguins recrutés par la tumeur.

15

- La famille des FGF humains est composée d'au moins 23 membres qui possèdent tous un domaine central conservé de 120 acides aminés. Ils exercent leur activité biologique en interagissant avec leurs récepteurs de haute affinité de type tyrosine-kinase (FGF-R) et des héparanes sulfate protéoglycanes, composants présents sur la
- 20 plupart des surfaces cellulaires et des matrices extracellulaires (site de liaison de faible affinité) pour former un complexe ternaire. Certains FGF présentent une haute affinité pour plusieurs FGF-R alors que d'autres activent spécifiquement un récepteur ou un isoforme d'un récepteur.

- 25 Un ligand spécifique de FGF-R4 a été identifié par Xie et al (Cytokine, 1999, 11:729-35.) Ce ligand, appelé FGF19, est un ligand de haute affinité au FGF-R4 exclusivement et dont la liaison au récepteur est dépendante de l'héparine ou des héparanes sulfates. Le FGF19 a été identifié chez l'animal adulte, uniquement au niveau des hépatocytes et de l'intestin grêle où il régule la synthèse d'acide biliaire
- 30 par le foie. Il serait un facteur de croissance intervenant lors du développement embryonnaire et serait impliqué dans le développement du cerveau fœtal chez le poisson zèbre et l'homme.

D'autres ligands de FGF-R4 sont décrits comme le FGF1 ou FGF2. Ces ligands activent fortement le FGF-R4 mais ne sont pas spécifiques de FGF-R4 : ils se lient aussi à d'autres FGF-R (Ornitz et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271:15292-7).

- 5 L'activation du récepteur FGF-R4 conduit à plusieurs types de signalisations cellulaires. Parmi celles-ci, la forme la plus classique correspondant à la mise en place d'une voie de signalisation par cascade de phosphorylation à la suite d'une stimulation de FGF-R4 par du FGF. Cette induction conduit à l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase de FGF-R4 et sert à initier une voie de signalisation
- 10 intracellulaire dépendante des phosphorylations d'autres protéines de signalisation telles que AKT, p44/42, JNK etc... Cette signalisation par phosphorylation varie selon le type cellulaire et selon les co-récepteurs ou les molécules d'adhésion présents à la surface de ces cellules. (Cavallaro et al., *Nat. Cell Biol.* 3/7, 650-657 (2001) ; Stadler et al., *Cell. Signal.* 18/6, 783-794. (2006) ; Lin et al., *J Biol Chem.*, 2007, 14:27277-84. (2007)). Un autre mode de signalisation important pour les FGF-R dont FGF-R4 est
- 15 l'internalisation du récepteur après activation en association avec son ligand. Ce mécanisme n'est pas dépendant de l'activité tyrosine kinase du récepteur mais d'une courte séquence en C-terminale de FGF-R4 (Klingenberg et al., *J. Cell Sci.*, 113/Pt10 :1827-1838 (2000)).
- 20
- Quatre formes distinctes de FGF-R4 sont décrites dans la littérature. Une forme de pleine taille avec 2 variants polymorphiques à la position 388 à savoir le FGF-R4 Gly388 qui est la forme normale du récepteur et la forme Arg388 qui est décrite dans le cadre de plusieurs tumeurs (Bange et al., *Cancer Res.* 62/3, 840-847 (2002) ;
- 25 Spinola et al., *J Clin Oncol* 23, 7307-7311(2005) ; Stadler et al., *Cell. Signal.* 18/6, 783-794. (2006)). Une forme soluble a également été découverte exprimée dans des cellules tumorales mammaires (Takaishi et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000, 267:658-62). Une quatrième forme, tronquée dans la partie extracellulaire, a été décrite dans certains adénomes hypophysaires (Ezzat et al., *J Clin Invest.*, 2002,
- 30 109:69-78).
- Le FGF-R4 est principalement exprimé dans les tissus dérivés de l'endoderme tels que le tractus gastro-intestinal, le pancréas, le foie, les muscles et les glandes surrénales.

21

Le FGF-R4 est connu dans la littérature comme ayant plusieurs rôles cellulaires, dont les trois principaux sont décrits dans ce qui suit :

- Premièrement, ce récepteur est impliqué dans le contrôle de différents processus de
- 5 différenciation cellulaire *in vitro* et *in vivo* comme la différenciation et la régénération des muscles squelettiques, la différenciation du tissu mésenchymateux , l'ostéogenèse ou encore dans la formation des alvéoles au cours du développement hépatique post-natal.
- 10 Deuxièmement, le FGF-R4 est décrit dans le contrôle de l'homéostasie de l'acide biliaire et du cholestérol et interviendrait dans le contrôle de l'adiposité. De plus, la balance entre la production de l'acide biliaire et celle du cholestérol est contrôlée par FGF-R4 *in vitro* et *in vivo*.
- 15 Troisièmement, le FGF-R4 est impliqué dans certains phénomènes tumoraux comme le développement des carcinomes hépatocellulaires ou des cancers du colon, dans la prolifération de cellules de fibroadénomes mammaires, de cellules épithéliales de cancers mammaires , comme la motilité des cellules de carcinomes mammaires ou colorectaux L'implication tumorale du FGF-R4 est majoritairement associée à
- 20 l'apparition du polymorphisme (Gly388Arg) corrélée à l'accélération de la progression tumorale de tumeurs mammaires et colorectales (Bange et al., *Cancer Res.* 62/3, 840-847.2002), prostatiques (Wang et al., *Clin. Cancer Res.*10/18, 6169-6178, 2004) ou hépatiques (Nicholes et al., *Am. J. Pathol.*160/6, 2295-307, 2002). Ce polymorphisme est aussi associé à un mauvais pronostic dans le cadre de sarcomes
- 25 (Morimoto et al., *Cancer* 98/10, 2245-2250, 2003), d'adénocarcinomes pulmonaires (Spinola et al., *J Clin Oncol* 23, 7307-7311, 2005) ou de sarcomes squameux (da Costa Andrade et al., *Exp Mol Pathol* 82, 53-7, 2007). La surexpression de FGF-R4 est aussi décrite dans certaines lignées de cancers pancréatiques (Shah et al., *Oncogene* 21/54, 8251-61, 2002) et corrèle avec la malignité d'astrocytomes
- 30 (Yamada et al., *Neurol. Res.* 24/3, 244-8, 2002). De plus, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-FGF19 dans des modèles *in vivo* de xénogreffes de tumeurs de colon ou dans des modèles de carcinomes hépatocellulaires, montre que l'inactivation du FGF19 et donc le blocage de l'activation de FGF-R4 peut être bénéfique dans le traitement de cancer du colon ou du foie.

Il est admis dans la littérature que les couples FGF/FGF-R1 et FGF/FGF-R2 participent à la formation des nouveaux vaisseaux sanguins dans un contexte normal ou pathologique. Cependant, l'implication potentielle de FGF-R4 dans le contrôle de ce phénomène cellulaire n'a jamais été étudiée. Il a, en effet, jusqu'à présent été supposé que l'activation de l'angiogenèse est médiée par FGF-R1 et/ou FGF-R2 (Presta et al, Cytokine Growth Factor Rev., 2005, 16 :159-78).

Des exemples d'antagonistes de FGF-R4 sont décrits dans la littérature, notamment: des petites molécules, mais elles ne ciblent pas le FGF-R4 de manière spécifique, entraînant ainsi des effets indésirables. Ainsi des petites molécules chimiques inhibitrices du domaine tyrosine-kinase qui inhibent plusieurs FGF-R ainsi que d'autres récepteur tyrosine-kinase ont été décrites par Thompson et al (Thompson et al *J Med Chem.*, 2000, 43:4200-11.). Des petites molécules chimiques inhibitrices des FGF-R par association à leur partie extracellulaire ont aussi été décrites dans la demande WO2007/080325.

Des anticorps ont aussi été étudiés, comme les anticorps anti-FGFR1 et/ou anti-FGFR4 décrits dans les demandes internationales WO2005/066211 et WO2008052796 ou par Chen et al (*Hybridoma* 24/3, 152-159, 2005). La demande WO2005/037235 décrit des anticorps antagonistes des FGF-R pour le traitement de l'obésité et du diabète. D'autre part, des anticorps anti-FGF-R4 agonistes sont décrits dans la demande WO03/063893.

La présente invention a pour objet un antagoniste du récepteur FGF-R4, caractérisé en ce qu'il se lie spécifiquement à celui-ci.

De manière avantageuse, ledit antagoniste est un anticorps spécifique du récepteur FGF-R4.

Dans un mode de réalisation, l'antagoniste objet de l'invention se lie au domaine D2-D3 du récepteur FGF-R4. Dans un mode de réalisation avantageux, l'antagoniste objet de l'invention se lie au domaine D2 du récepteur FGF-R4. Dans un mode encore plus avantageux, l'antagoniste se lie à la séquence SEQ ID NO 70.

23

De manière avantageuse l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 a un  $K_D$  vis à vis du récepteur FGF-R4 déterminé par la technique Biacore inférieur à  $10E-8$  M, inférieur à  $5 \times 10E-9$ M, inférieur à  $2 \times 10E-9$ M ou inférieur à  $1 \times 10E-9$ M.

- 5 Dans un mode de réalisation avantageux l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 est actif à la fois contre FGF-R4 humain et FGF-R4 murin.

Dans un autre mode de réalisation avantageux l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 est actif à la fois contre FGF-R4 humain, FGF-R4 murin et FGF-R4 de rat.

- 10 Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend au moins un CDR présentant une séquence identique à SEQ ID NO : 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ou 110 ou au moins un CDR dont la séquence diffère de un à deux acides aminés par rapport aux séquences SEQ ID NO
- 15 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ou 110, pour autant que l'anticorps garde sa spécificité de liaison.

- Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 9, 10,
- 20 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ou 110 ou des CDR dont les séquences diffèrent de un à deux acides aminés par rapport – respectivement – aux séquences sus-citées, pour autant que cela ne modifie pas la spécificité de liaison de l'anticorps au récepteur FGF-R4.

- 25 Dans un mode de réalisation avantageux, les anticorps de l'invention comprennent au moins une chaîne lourde et au moins une chaîne légère, ladite chaîne lourde comprenant trois séquences CDR ayant des séquences en acides aminés sélectionnées dans le groupe consistant en SEQ ID NO : 9, 10 et 11 ou 73, 74 et 75, 83, 84 et 85, ou 93, 94 et 95, ou 103, 104 et 105 ladite chaîne légère comprenant trois
- 30 séquences CDR ayant des séquences en acides aminés sélectionnées dans le groupe consistant en SEQ ID NO : 12, 13 et 14 ou 78, 79 et 80, ou 88, 89 et 90, ou 98, 99 et 100, ou 108, 109 et 110.

Dans un mode de réalisation avantageux les parties variables de la chaîne lourde de l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprennent une séquence présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 6, 77, 87, 97 ou 107.

- 5 Dans un mode de réalisation avantageux les parties variables de la chaîne légère de l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprennent une séquence présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 8, 72, 82, 92 ou 102.

- 10 La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde comprenant une partie variable codée par une séquence nucléotidique présentant une identité d'au moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO : 5, 76, 86, 96 ou 106.

- 15 La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère comprenant une partie variable codée par une séquence nucléotidique présentant une identité d'au moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO 7, 71, 81, 91 ou 101.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde comprenant une partie variable de séquence polypeptidique SEQ ID NO : 6, 77, 87, 97 ou 107.

- 20 La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère comprenant une partie variable de séquence polypeptidique SEQ ID NO : 8, 72, 82, 92 ou 102.

- 25 La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant des séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 5 et 7 ou 71 et 76, ou 81 et 86, ou 91 et 96, ou 101 et 106.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 6 et 8, ou 72 et 77, ou 82 et 87, ou 92 et 97 ou 102 et 107.

- 30 Dans un mode de réalisation avantageux l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend des séquences identiques au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% aux SEQ ID NO : 2 et/ou SEQ ID NO : 4 ; ou SEQ ID NO : 72 et/ou SEQ ID NO : 77 ; ou SEQ ID NO : 82 et/ou SEQ ID NO : 87 ; ou SEQ ID NO : 92 et/ou SEQ ID NO : 97 ; ou SEQ ID NO : 102 et/ou SEQ ID NO : 107.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend une chaîne lourde codée par une séquence nucléotidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence

5 SEQ ID NO 1.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde de séquence polypeptidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 2.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du  
10 récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère codée par une séquence nucléotidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 3.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère de séquence polypeptidique  
15 identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 4.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1 et 3.

Dans un mode encore plus avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique de FGF-R4  
20 comprend une chaîne lourde comprenant la séquence SEQ ID NO 2 et une chaîne légère comprenant la séquence SEQ ID NO 4.

L'anticorps composé d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO 2 et d'une séquence légère SEQ ID NO 4 sera appelé 40-12 dans la suite de la demande.

25

Dans un mode de réalisation de l'invention les anticorps spécifiques de FGF-R4 sont actifs à la fois contre FGF-R4 humain, FGF-R4 murin et FGF-R4 de rat.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-  
30 R4 induit une inhibition des voies cellulaires AKT/p38.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 induit une inhibition des voies cellulaires Erk1/2.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 induit une inhibition des voies signalisation cellulaire contrôlées par FGF-R4

28

Dans un autre mode de réalisation avantageux l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 induit une inhibition de la prolifération cellulaire tumorale.

Dans encore un autre mode de réalisation avantageux antagoniste spécifique du  
5 récepteur FGF-R4 induit une inhibition de l'angiogenèse.

Dans un autre mode de réalisation particulièrement avantageux, l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 présente une affinité pour FGF-R4 10 fois supérieure à son affinité pour les autres récepteurs à FGF.

10

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, l'anticorps selon l'invention est un anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4.

Dans un mode de réalisation l'anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend une chaîne légère dont la partie variable est codée par  
15 une séquence nucléotidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 29 ou à la séquence SEQ ID NO 31.

Dans un autre mode de réalisation l'anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend une chaîne légère dont la partie variable est identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 30 ou à la séquence  
20 SEQ ID NO 32.

Dans un autre mode de réalisation l'anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend une chaîne légère dont la partie variable est codée par une séquence identique à la séquence nucléotidique SEQ ID NO 29 ou à la séquence SEQ ID NO : 31.

25 La présente invention a également pour objet un anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde dont la partie variable est codée par une séquence identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 33, à la séquence SEQ ID NO 35 ou à la séquence SEQ ID NO 37.

30 La présente invention a également pour objet un anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde dont la partie variable est identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 34, à la séquence SEQ ID NO 36 ou à la séquence SEQ ID NO 38.

La présente invention a également pour objet un anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde codée par une séquence nucléotidique SEQ ID NO 33 et/ou SEQ ID NO : 35 et/ou SEQ ID NO : 37.

La présente invention a également pour objet un anticorps humanisé antagoniste  
5 spécifique du récepteur FGF-R4 dont les séquences humanisées de séquence SEQ ID NO : 30 ou 32 sont utilisées en combinaison avec les séquences humanisées de séquence SEQ ID NO : 34, 36 ou 38.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 73, 74, 75, 78, 79 et 80 ou  
10 des CDR dont les séquences diffèrent de un à deux acides aminés par rapport – respectivement – aux séquences suscitées, pour autant que cela ne modifie pas la spécificité de liaison de l'anticorps au récepteur FGF-R4.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 83, 84, 85, 88, 89 et 90 ou  
15 des CDR dont les séquences diffèrent de un à deux acides aminés par rapport – respectivement – aux séquences suscitées, pour autant que cela ne modifie pas la spécificité de liaison de l'anticorps au récepteur FGF-R4.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 93, 94, 95, 98, 99 et 100 ou  
20 des CDR dont les séquences diffèrent de un à deux acides aminés par rapport – respectivement – aux séquences suscitées, pour autant que cela ne modifie pas la spécificité de liaison de l'anticorps au récepteur FGF-R4.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 103, 104, 105, 108, 109 et  
25 110 ou des CDR dont les séquences diffèrent de un à deux acides aminés par rapport – respectivement – aux séquences suscitées, pour autant que cela ne modifie pas la spécificité de liaison de l'anticorps au récepteur FGF-R4.

Dans un mode de mise en œuvre préféré de l'invention, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 83,  
30 84, 85, 88, 89 et 90.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 est un anticorps humain dont les parties variables de la chaîne

28

lourde comprennent une séquence nucléotidique présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 76, 86, 96 ou 106.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 est un anticorps humain dont les parties variables de la chaîne

5 légère comprennent une séquence nucléotidique présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 71, 81, 91 ou 101.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde comprenant une partie variable codée par une séquence protéique présentant une identité d'au moins

10 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO : 77, 87, 97 ou 107.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère comprenant une partie variable codée par une séquence protéique présentant une identité d'au moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO : 72, 82, 92 ou 102.

15

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant des séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 71 et 76 ou les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 81 et 86 ou les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 91 et 96 ou les

20 séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 101 et 106.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 72 et 77 ou les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 82 et 87 ou les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 92 et 97 ou les séquences polypeptidiques

25 SEQ ID NO : 102 et 107.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend des séquences identiques au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% aux SEQ ID NO : 72 et/ou SEQ ID NO : 77.

30 Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend des séquences identiques au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% aux SEQ ID NO : 82 et/ou SEQ ID NO : 87.

29

Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend des séquences identiques au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% aux SEQ ID NO : 92 et/ou SEQ ID NO : 97.

Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'anticorps humain antagoniste  
5 spécifique du récepteur FGF-R4 comprend des séquences identiques au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% aux SEQ ID NO : 102 et/ou SEQ ID NO : 107.

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention a pour objet un anticorps antagoniste humain spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère  
10 codée par une séquence nucléotidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 82 et comprenant une chaîne légère de séquence polypeptidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 87.

De manière encore plus préférée, la présente invention a pour objet un anticorps  
15 humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 82 et 87.

L'anticorps composé d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO 77 et d'une séquence légère SEQ ID NO 72 sera appelé clone 8 dans la suite de la demande.

20 L'anticorps composé d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO 87 et d'une séquence légère SEQ ID NO 82 sera appelé clone 31 dans la suite de la demande.

L'anticorps composé d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO 97 et d'une séquence légère SEQ ID NO 92 sera appelé clone 33 dans la suite de la demande.

L'anticorps composé d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO 107 et d'une  
25 séquence légère SEQ ID NO 102 sera appelé clone 36 dans la suite de la demande.

Le champ de la présente invention ne se limite pas aux anticorps comprenant ces séquences. En effet, tous les anticorps qui se lient de manière spécifique à FGF-R4 en ayant une action antagoniste sur ce récepteur, rentrent dans le champ de la  
30 présente invention.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 conjugué à un agent cytotoxique.

30

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 dans le traitement des maladies associées à l'angiogenèse.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 dans le traitement d'un cancer.

- 5 La présente invention a pour objet l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 dans le traitement des hépatocarcinomes ou de tout autre type de cancer hépatique.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 dans le traitement du cancer du pancréas.

- 10 La présente invention a pour objet un anticorps spécifique du récepteur FGF-R4 utile à la fois dans le traitement des maladies associées à l'angiogenèse et dans le traitement des hépatocarcinomes ou de tout autre type de cancer hépatique.

La présente invention a pour objet un anticorps spécifique du récepteur FGF-R4 utile à la fois dans le traitement des maladies associées à l'angiogenèse, dans le

- 15 traitement des hépatocarcinomes ou de tout autre type de cancer hépatique, dans le traitement du cancer du pancréas, des organes du tractus gastro-intestinal ou tout autre organe exprimant FGF-R4.

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant un

- 20 antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 et des excipients.

La présente invention a pour objet une méthode de traitement d'un cancer comprenant l'administration au patient d'un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4.

- 25 La présente invention a pour objet une méthode de traitement d'une maladie associée à une augmentation pathologique de l'angiogenèse comprenant l'administration au patient d'un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4.

La présente invention a pour objet un procédé de sélection d'un anticorps monoclonal

- 30 antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4, comprenant les étapes suivantes :
- a. immunisation chez la souris
  - b. prélèvement de nodules lymphatiques chez les souris, et
  - c. criblage des surnageants d'hybridomes

La présente invention a pour objet une lignée cellulaire produisant des anticorps antagonistes spécifiques du récepteur FGF-R4.

La présente invention a pour objet un procédé de production d'un anticorps  
5 antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant la mise en culture d'une lignée cellulaire produisant des anticorps antagonistes du récepteur FGF-R4.

La présente invention a pour objet un médicament comprenant un antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4.

10

La présente invention a également pour objet un polynucléotide codant pour un polypeptide sélectionné dans le groupe constitué des SEQ ID NOS : 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 30, 32, 34, 36, 38, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 109, 110 et des  
15 séquences identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à l'une de ces séquences.

La présente invention a pour objet un vecteur recombinant comprenant un polynucléotide tel que décrit ci dessus ou codant pour un polypeptide tel que décrit ci dessus.

20

Afin de permettre l'expression de chaînes lourdes et/ou chaînes légères de l'anticorps antagoniste du récepteur FGF-R4, objet de l'invention, les polynucléotides codant pour lesdites chaînes sont insérés dans des vecteurs d'expression. Ces vecteurs d'expression peuvent être des plasmides, des YACs, des cosmides, des rétrovirus,  
25 des épisomes dérivés d'EBV, et tous les vecteurs que l'homme du métier peut juger appropriés à l'expression desdites chaînes.

La présente invention a pour objet une cellule hôte comprenant un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus.

30

**Description détaillée de l'invention**

32

La présente invention a pour objet l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre FGF-R4 (sans réaction croisée avec FGF-R1, R2 ou R3) pour l'inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale.

- 5 De façon inattendue, les inventeurs ont montré que le FGF-R4 joue un rôle actif et spécifique dans le contrôle de l'angiogenèse.

- Cette fonction du FGF-R4 n'avait jamais été montrée ou proposée auparavant. Par conséquent, ce récepteur peut être utilisé en tant que cible pour traiter les pathologies
- 10 présentant un dysfonctionnement angiogénique. Les ligands du FGF-R4 capables de moduler son activité sont donc des agents thérapeutiques potentiels pour de nombreuses pathologies liées à l'angiogenèse.

- La présente invention peut donc être utilisée dans le traitement de toutes les
- 15 pathologies impliquant une dérégulation de l'angiogenèse et nécessitant une inhibition de celle-ci. Les pathologies visées peuvent être le cancer, avec l'utilisation des antagonistes selon l'invention comme inhibiteurs de l'angiogenèse tumorale, ou les pathologies pour lesquelles une dérégulation de l'angiogenèse est décrite comme : la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou DMLA, les maladies inflammatoires comme
- 20 l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoarthrite, les colites, les ulcères ou toute maladie inflammatoire des intestins, l'athérosclérose ou encore dans le traitement de l'obésité. L'utilisation de ces anticorps est aussi illustrée dans l'inhibition de la croissance tumorale. Les antagonistes selon la présente invention peuvent donc être utilisés pour le traitement de certains cancers impliquant une dérégulation du FGF-R4, et plus
- 25 particulièrement les cancers du foie, du colon, du sein, du poumon, de la prostate, du pancréas, de la peau ou de l'œsophage.

- Un des avantages majeurs des antagonistes selon la présente invention est de cibler spécifiquement un récepteur aux FGF, en l'occurrence FGF-R4. Cette spécificité
- 30 permet de limiter les effets indésirables que peuvent avoir des petites molécules chimiques inhibitrices du domaine tyrosine kinase. De plus, le FGF-R4 n'étant pas exprimé de manière ubiquitaire, mais étant notamment exprimé sur les cellules endothéliales comme sur les cellules hépatocytaires, biliaires, mammaires, prostatiques, ovariennes, pancréatiques, rénales, on dispose d'un mode de traitement

des maladies liées à une dérégulation de l'activité FGF-R4 limitant les effets secondaires.

Par « antagoniste », on entend tout ligand capable de diminuer ou d'inhiber  
5 totalement l'activité du FGF-R4. Ce composé antagoniste est aussi appelé inhibiteur de FGF-R4.

Cet antagoniste peut-être tout ligand de FGF-R4 tel qu'une molécule chimique, une protéine recombinante, un oligosaccharide, un polysaccharide, un oligonucléotide ou  
10 un anticorps capable de se lier de manière spécifique au récepteur FGF-R4, à l'exclusion de tout autre FGFR.

Un objet de l'invention est donc un antagoniste spécifique de FGF-R4. Selon l'invention, un antagoniste qui se lie spécifiquement au FGF-R4 s'entend d'un ligand  
15 qui ne se lie aux autres récepteurs aux FGF à savoir FGF-R1, FGF-R2 ou FGF-R3. En particulier, un anticorps spécifique de FGF-R4 est un anticorps qui ne présente pas de réaction croisée avec FGF-R1, FGF-R2 ou FGF-R3.

Une liaison spécifique s'entend d'une différence d'un facteur au moins 10 entre l'intensité de la liaison à un récepteur par rapport à un autre, ici entre la liaison à FGF-  
20 R4 et les liaisons possibles à FGF-R1, FGF-R2 ou FGF-R3.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le ligand de FGF-R4 est un oligosaccharide ou un polysaccharide.

Un oligosaccharide s'entend de tout polymère de saccharide contenant de trois à dix  
25 unités de sucres simples. Il existe des oligosaccharides naturels, comme par exemple les fructo-oligosaccharides (FOS), et des oligosaccharides de synthèse comme par exemple les anti-thrombotiques mimétiques de l'héparine.

Par « polysaccharide », on entend tout polymère constitué de plus de dix monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Il existe des  
30 polysaccharides naturels, comme par exemple les mucopolysaccharides, les fucoïdes, les carraghénanes, les exopolysaccharides bactériens et des polysaccharides de synthèse. Ainsi, des fucoïdanes de bas poids moléculaires ou des exopolysaccharides très sulfatés ont montré des activités pro-angiogène (Chabut et al., *Mol Pharmacol.*, 2003, 64:696-702 ; Matou et al., *Biochem Pharmacol.*, 2005,

34

69:751-9.). A l'inverse, des oligosaccharides faiblement sulfatés dérivés de l'héparine ou des phosphomannopentose sulfate peuvent présenter des caractéristiques anti-angiogènes (Parish et al., 1999, 15:3433-41 ; Casu et al., *J Med Chem.*, 2004, 12:838-48)

5

Dans un mode de réalisation de l'invention, le ligand de FGF-R4 est un anticorps.

Par « anticorps », on entend tout type d'anticorps ou molécules dérivés tels que les anticorps polyclonaux et monoclonaux. Parmi les molécules dérivées des anticorps  
10 monoclonaux, sont compris les anticorps humanisés, les anticorps humains, les anticorps multispécifiques, les anticorps chimériques, les fragments d'anticorps, les nanobodies...

Dans un mode de réalisation de l'invention, l'antagoniste spécifique de FGF-R4 est un  
15 anticorps polyclonal.

Un « anticorps polyclonal » est un anticorps qui a été produit parmi un mélange d'anticorps provenant de plusieurs clones de lymphocytes B et reconnaissant une série d'épitopes différents.

20 Dans un mode de réalisation avantageux, l'antagoniste spécifique de FGF-R4 est un anticorps monoclonal.

Un « anticorps monoclonal » est un anticorps obtenu à partir d'une population d'anticorps substantiellement homogène issue d'un seul type de lymphocytes B amplifiée de manière clonale. Les anticorps formant cette population sont identiques  
25 excepté pour de possibles mutations naturelles pouvant être présentes en quantité très faible. Ces anticorps sont dirigés contre un seul épitope et sont donc hautement spécifiques.

Par « épitope » on entend le site de l'antigène auquel se lie l'anticorps. Si l'antigène  
30 est un polymère, tel une protéine ou un polysaccharide, l'épitope peut être formé par des résidus contigus ou non-contigus.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'anticorps antagoniste anti-FGF-R4 se lie à un épitope appartenant au domaine D2-D3 du récepteur au FGF-R4.

35

Dans un mode encore plus avantageux, l'anticorps se lie à un épitope compris dans le domaine comprenant les acides aminés 144 à 365 du récepteur au FGF-R4.

Dans un mode encore plus avantageux, l'anticorps se lie à un épitope compris dans le domaine D2 du récepteur au FGF-R4, cet épitope correspondant aux acides aminés  
5 145 à 242 décrits dans la séquence SEQ ID NO 70.

Un anticorps, aussi appelé immunoglobuline, est composé de deux chaînes lourdes identiques (« VH ») et de deux chaînes légères identiques (« VL ») qui sont liées par un pont disulfure. Chaque chaîne contient une région constante et une région  
10 variable. Chaque région variable comprend trois segments appelés « régions déterminant la complémentarité » (« CDRs ») ou « régions hypervariables », qui sont principalement responsables de la liaison à l'épitope d'un antigène.

Le terme « VH » fait référence aux régions variables d'une chaîne lourde  
15 d'immunoglobuline d'un anticorps, incluant les chaînes lourdes d'un fragment Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' ou F(ab)'.

Le terme « VL » fait référence aux régions variables d'une chaîne légère  
20 d'immunoglobuline d'un anticorps, incluant les chaînes légères d'un fragment Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' ou F(ab)'.

Par « fragment d'anticorps » on entend toute partie de celui-ci : Fab (Fragment antigen binding), Fv, scFv (single chain Fv), Fc (Fragment cristallisable). De préférence, ces fragments fonctionnels seront des fragments de type Fv, scFv, Fab,  
25 F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc ou diabodies, qui possèdent généralement la même spécificité de fixation que l'anticorps monoclonal, chimérique ou humanisé dont ils sont issus. Selon la présente invention, des fragments d'anticorps de l'invention peuvent être obtenus à partir des anticorps monoclonaux, chimériques ou humanisés, par des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne  
30 et/ou par clivage des ponts disulfures par réduction chimique.

Par « régions CDR ou CDRs », on entend désigner les régions hypervariables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines comme définies par Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5<sup>th</sup> Ed., U.S.

Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). Il existe 3 CDRs de chaîne lourde et 3 CDRs de chaîne légère. Le terme CDR ou CDRs est utilisé ici pour désigner suivant les cas, l'une de ces régions ou plusieurs, voire l'ensemble, de ces régions qui contiennent la majorité des résidus d'acides aminés responsables de la liaison affine de l'anticorps pour l'antigène ou l'épitope qu'il reconnaît. Les régions les plus conservées des domaines variables sont appelés régions ou séquences FR pour « framework » ou régions « charpentes ».

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'antagoniste spécifique de FGF-R4 est un anticorps chimérique.

Par « anticorps chimérique » on entend un anticorps dans lequel la région constante, ou une portion de celle-ci, est altérée, remplacée ou échangée, telle que la région variable est liée à une région constante d'une espèce différente, ou appartient à une autre classe ou sous-classe d'anticorps.

On entend également par « anticorps chimérique » un anticorps dans lequel la région variable, ou une portion de celle-ci, est altérée, remplacée ou échangée, telle que la région constante est liée à une région variable d'une espèce différente, ou appartient à une autre classe ou sous-classe d'anticorps.

Les méthodes de production d'anticorps chimériques sont connues de l'homme du métier. Voir par exemple, Morrison, 1985, *Science*, **229** :1202 ; Oi *et al.*, 1986, *Bio Techniques*, **4** :214 ; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods*, **125** :191-202 ; U.S. Pat. Nos. 5,807,715 ; 4,816,567 ; and 4,816,397.

Ces versions chimériques de l'anticorps peuvent consister en la fusion des parties variables VL et VH aux parties constantes de Ckappa et CH (IgG1) d'origine humaine afin de générer un anticorps monoclonal chimère.

La partie CH (IgG1) peut aussi être modifiée par des mutations ponctuelles afin d'augmenter l'affinité du fragment Fc pour le récepteur FcγRIIIa et par là même augmenter les fonctions effectrices de l'anticorps (Lazar *et al.*, 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** : 4005-4010 ; Stavenhagen *et al.*, 2007, *Cancer Res.* **67** : 8882-8890).

La présente invention inclut les versions humanisées des anticorps.

37

Par « anticorps humanisé » on entend un anticorps qui contient principalement des séquences immunoglobuline humaines. Ce terme fait généralement référence à une immunoglobuline non humaine qui a été modifiée par incorporation de séquences humaines ou de résidus trouvés dans des séquences humaines.

5

En général, les anticorps humanisés comprennent un ou typiquement deux domaines variables dans lesquels tout ou partie des régions CDR correspondent à des parties issues de la séquence parente non humaine et dans lesquels tout ou partie des régions FR sont ceux issus d'une séquence immunoglobuline humaine. L'anticorps humanisé peut alors comprendre au moins une portion d'une région constante d'immunoglobuline (Fc), en particulier celle de l'immunoglobuline humaine de référence choisie.

On cherche ainsi à obtenir un anticorps qui soit immunogène a minima chez un humain. Ainsi il est possible qu'un ou deux acides aminés d'un ou plusieurs CDRs soient modifiés par un acide aminé moins immunogène pour l'hôte humain, ceci sans réduire substantiellement la spécificité de liaison de l'anticorps au FGF-R4. De même, les résidus des régions charpentes peuvent ne pas être humains et il est possible qu'ils ne soient pas modifiés car ils ne contribuent pas au potentiel immunogénique de l'anticorps.

20

Il existe plusieurs méthodes d'humanisation connues de l'homme du métier pour modifier un anticorps parent non-humain en un anticorps moins immunogène pour l'humain. Une identité globale des séquences avec un anticorps humain n'est pas forcément nécessaire. En effet l'identité globale de séquence n'est pas nécessairement un indicateur prédictif d'une immunogénicité réduite et la modification d'un nombre limité de résidus peut conduire à des anticorps humanisés présentant un potentiel immunogénique très atténué chez l'homme (Molecular Immunology (2007) 44, 1986-1998).

30

Diverses méthodes sont par exemple l'inclusion de CDRs (grafting) (EPO 0 239 400; WO 91/09967; et U.S. Pat. Nos. 5,530,101 et 5,585,089), le resurfacing (EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814; et Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973) ou encore le mélange des chaînes (U.S. Pat. No. 5,565,332).

La présente invention concerne en particulier des anticorps humanisés dont les parties variables sont modifiées selon la technologie suivante:

- Les chaînes légères et lourdes les plus similaires aux chaînes correspondantes de
- 5 l'anticorps murin anti-FGF-R4 40-12 sont identifiées par comparaison à la Protein Data Bank (H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. Nucleic Acids Research, 2000, 28 :235-242). L'alignement de séquences utilise l'algorithme BLAST (J Mol Biol. 1990 Oct 215:403-410). Il s'agit des structures tridimensionnelles répondant aux codes PDB 1NDM &
- 10 1ETZ qui ont été respectivement utilisées pour construire les modèles par homologie des chaînes légères et lourdes des domaines variables. Ces modèles tridimensionnels sont ensuite affinés en minimisant leur énergie potentielle avec la procédure standard implémentée dans le logiciel MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Quebec, Canada). Une simulation de
- 15 dynamique moléculaire (DM) est ensuite réalisée à partir de ces modèles tridimensionnels minimisés de l'anticorps avec le logiciel Amber (D.A. Case, T.E. Cheatham, III, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K.M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang and R. Woods. J. Computat. Chem. 2005, 26 :1668-1688). Cette simulation a lieu avec des contraintes harmoniques appliquées aux atomes du
- 20 squelette protéique à une température de 500K pendant une durée de 1,1 nanoseconde dans un modèle de solvant implicite tel qu'implémenté dans la méthode généralisée de Born (Gallicchio & Levy, J Comput Chem 2004, 25:479-499). Dix conformations diverses sont ainsi extraites de cette première simulation à raison d'une conformation tridimensionnelle toutes les cent picosecondes pendant la
- 25 dernière nanoseconde de la simulation. Ces dix conformations diverses sont ensuite chacune soumises à une simulation de dynamique moléculaire, sans contraintes sur le squelette protéique, à une température de 27 °C pendant 2,3 nanosecondes dans un modèle de solvant implicite tel qu'implémenté dans la méthode généralisé de Born. Les liaisons impliquant un atome hydrogène sont contraintes avec l'algorithme
- 30 SHAKE (Barth. et al., J Comp Chem, 1995, 16:1192-1209), le pas est de 1 femto seconde, et la simulation a lieu selon l'équation de Langevin à volume constant et une température constante de 27°C. Pour chacune des dix simulations de dynamique moléculaire, les dernières deux mille conformations, extraites à la fréquence d'une par picoseconde, sont ensuite utilisées pour quantifier, pour chaque acide-aminé de

l'anticorps à humaniser, la déviation des positions des atomes par rapport à une conformation moyenne, dite médoïde, de l'acide aminé. L'ensemble de l'analyse décrite ci-après est réalisée avec le langage de script Scientific Vector Language (SVL) du logiciel MOE. La conformation médoïde de l'acide aminé est la conformation

5 issue de la dynamique moléculaire qui est la plus proche de la conformation moyenne calculée à partir de la position des atomes de toutes les conformations de l'acide aminé. La distance utilisée pour détecter la conformation médoïde est l'écart quadratique moyen des distances scalaires entre les atomes de deux conformations de l'acide aminé. De manière similaire, la déviation des positions des atomes d'une

10 conformation d'un acide-aminé par rapport à la conformation médoïde est quantifiée en calculant l'écart quadratique moyen des distances scalaires entre les atomes de l'acide aminé d'une conformation de la simulation et les mêmes atomes de la conformation médoïde. Par la suite, c'est en comparant l'écart quadratique moyen des positions des atomes d'un acide amine donné (i) moyenné sur l'ensemble des dix

15 simulations de dynamique moléculaire (Fi), à l'écart quadratique moyen des positions de tous les acides-aminés de l'anticorps moyenné sur l'ensemble des dix simulations de dynamique moléculaire (Fm) que l'on décide si l'acide-aminé est assez flexible pour être considéré comme pouvant potentiellement interagir avec les récepteurs de cellules T et provoquer l'activation du système immunitaire. Un acide-aminé i est

20 considéré comme flexible s'il présente un score de flexibilité Zi au-dessus de 0,15 tel que défini ci-après :  $Z_i = (F_i - F_m)/F_m$ . 45 acides-aminés sont ainsi identifiés comme flexible dans le domaine variable de l'anticorps, à l'exclusion de la région déterminant la complémentarité à l'antigène (RDC) et de son environnement immédiat. On définit l'environnement immédiat de la RDC comme tout acide-aminé dont le carbone alpha

25 se situe à une distance de 5 angströms (Å) ou moins d'un carbone alpha de la RDC.

Les mouvements des 60 acide-aminés les plus flexibles de l'anticorps, pendant les 20 nanosecondes (10x2ns) de simulation, sont ensuite comparés aux mouvements des acide-aminés correspondants de 49 modèles par homologie de séquences

30 germinales humaines d'anticorps, pour chacun desquels les dix simulations de dynamique moléculaire (10x2ns) ont été réalisées selon le même mode opératoire. Les 60 acide-aminés les plus flexibles excluent la région déterminant la complémentarité à l'antigène (RDC) et son environnement immédiat. Les 49 modèles humains de séquences germinales d'anticorps ont été construits en combinant

40

systématiquement les 7 chaînes légères humaines les plus fréquentes (vk1, vk2, vk3, vk4, vlamba1, vlamba2, vlamba3) et les 7 chaînes lourdes humaines les plus fréquentes (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) (Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593-D597).

- 5
- La similarité de l'anticorps à humaniser aux 49 modèles de séquences humaines germinales est quantifiée en échantillonnant les positions de certains atomes des 60 acides-aminés flexibles d'un anticorps, au cours des dix dynamiques moléculaires, au moyen d'une même grille cubique tridimensionnelle de résolution 1Å. On parle de
- 10
 

similarité quadridimensionnelle. La grille tridimensionnelle utilisée comporte 445740 points et elle est initialisée à partir de la structure tridimensionnelle de l'anticorps humain répondant au code PDB 8FAB. La structure 8FAB est aussi utilisée pour positionner toutes les conformations d'un anticorps à échantillonner dans la grille tridimensionnelle. On superpose pour ce faire la conformation médoïde de la
- 15
 

dynamique moléculaire de l'anticorps sur la structure 8FAB. Cette superposition consiste en l'alignement des moments d'inertie des deux conformations, suivi de l'optimisation des distances scalaires entre les atomes de carbone alpha des deux conformations. Toutes les autres conformations de la dynamique moléculaire de l'anticorps sont superposées sur la conformation médoïde selon la même méthode.
- 20
 

Deux types d'échantillonnage sont réalisés résultant en deux similarités (similarité électrostatique et similarité lipophile), pour un couple d'anticorps à comparer, que l'on additionne pour obtenir la similarité totale. Le premier échantillonnage, électrostatique, considère tous les atomes de la chaîne latérale de l'acide-aminé. La valeur en un point x de la grille se calcule en appliquant aux atomes de la chaîne
- 25
 

latérale de l'acide aminés une fonction gaussienne tridimensionnelle  $f(x)$  que l'on pondère avec la charge électrostatique de l'atome telle que décrite dans le champ de force Amber99 (Cieplak, J., et al.; J. Comp. Chem. 2001, 22 :1048-1057). La fonction  $f(x)$  est appliquée selon les 3 axes de coordonnées cartésiennes et répond à la
- formule :  $f(x) = \left(s\sqrt{2\pi}\right)^{-3} \times \exp\left(\frac{-(x-u)^2}{2s^2}\right)$ , avec x et u respectivement coordonnées
- 30
 

cartésiennes d'un point x de la grille et d'un atome échantillonné,  $s = r/1,6$  (r = rayon de covalence de l'atome). L'échantillonnage est répété pour toutes les conformations de l'acide aminé et les résultats obtenus sont moyennés en tout point x de la grille tridimensionnelle. Le deuxième échantillonnage, lipophile, considère uniquement les atomes lipophiles de la chaîne latérale de l'acide aminé. La valeur en un point x de la

grille se calcule à l'aide de la même fonction gaussienne  $f(x)$  sans pondération. Les deux ensembles de conformations des dynamiques moléculaires des deux anticorps que l'on compare sont ainsi échantillonnés par la même grille tridimensionnelle. On mesure la similarité électrostatique (*sim-elec*), entre 2 anticorps a et b, à l'aide de la

5 formule suivante : 
$$\text{sim} - \text{elec} = \frac{\sum_{i=1}^{445740} (|x_i^a + x_i^b| - |x_i^a - x_i^b|)}{\sum_{i=1}^{445740} (|x_i^a + x_i^b|)}$$
. La similarité lipophile est

calculée avec la même formule sur les données issues de l'échantillonnage lipophile décrit ci-dessus.

Le modèle de séquences germinales humaines vlamba2-vh2 montre ainsi la plus forte similarité quadridimensionnelle (similarité totale = 58 %) de ces 60 acide-aminés flexibles par rapport aux acide-aminés flexibles de l'anticorps murin 40-12. Le modèle

10 de séquence germinale humaine vlamba2-vh2 a donc été utilisé pour humaniser l'anticorps à humaniser en se focalisant sur les 45 acide-aminés flexibles. Pour déterminer les mutations à opérer, la structure tridimensionnelle du modèle de l'anticorps murin 40-12 est superposée à celle du modèle issu des séquences

15 germinales montrant la plus forte similarité en optimisant les positions des carbones alpha des acides aminés. Les acides aminés identifiés comme flexibles sont mutés par les acides aminés correspondant dans la séquence du modèle montrant la plus forte similarité.

Les motifs de séquences indésirables considérés sont les suivants: Aspartate-Proline

20 (liaison peptidique labile en milieu acide), Asparagine-X-Serine/Thréonine (site de glycosylation, X=tout acide-aminé sauf Proline), Aspartate-Glycine/Serine/Thréonine (formation potentielle de succinimide/iso-aspartate dans les zones flexibles), Asparagine-Glycine/Histidine/Serine/Alanine/Cystéine (sites exposés de déamidation), Methionine (oxydation dans les zones exposées). Les séquences

25 humanisées ainsi obtenues sont finalement comparées, au moyen de l'algorithme BLAST de comparaison de séquence, aux séquences de la base de données IEDB (<http://www.immuneepitope.org/> The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. PLoS Biol. 2005 Mar;3(3):e91) pour s'assurer que les séquences ne contiennent pas d'épitopes connus pour être reconnu par les

30 cellules lymphocytes B et T. Si la séquence contient des résidus qui présentent des séquences indésirables, elles sont alors aussi modifiées. Si la séquence composite

contient un épitope connu répertorié dans l'IEDB, une autre structure de référence germinale montrant une forte similarité est alors utilisée comme modèle.

De manière plus avantageuse, l'anticorps selon l'invention comprend des séquences  
5 présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO 30 ou la séquence SEQ ID NO 32 sont utilisées, en combinaison avec les séquences présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO 34, séquence SEQ ID NO 36 ou la séquence SEQ ID NO 38.

10 Dans un mode de réalisation, l'anticorps selon l'invention comprend des chaînes variables légères de séquence SEQ ID NO 30 et des chaînes variables lourdes de séquence SEQ ID NO 34.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend des chaînes variables légères de séquence SEQ ID NO 32 et des chaînes variables lourdes de séquence  
15 SEQ ID NO 38.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend des chaînes variables légères de séquence SEQ ID NO 30 et des chaînes variables lourdes de séquence SEQ ID NO 36.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend des chaînes variables  
20 légères de séquence SEQ ID NO 32 et des chaînes variables lourdes de séquence SEQ ID NO 34.

Dans un autre mode de réalisation l'anticorps comprend des chaînes variables légères de séquences SEQ ID NO 32 et des chaînes variables lourdes de séquence  
25 SEQ ID NO 36.

Dans un autre mode de réalisation l'anticorps comprend des chaînes variables légères de séquences SEQ ID NO 30 et des chaînes variables lourdes de séquence SEQ ID NO 38.

30 La présente invention a également pour objet des anticorps humains antagonistes spécifiques du FGF-R4. De tels anticorps peuvent être obtenus par phage display selon des méthodes connus de l'homme du métier (McCafferty J. *et al*, 1990 ; Hoogenboom, HR *et al*, 2005 ). D'autres technologies sont disponibles pour la

préparation d'anticorps humains telles que la technologie XenoMouse décrite dans le brevet U.S. 5,939,598.

Dans un mode de réalisation particulier, l'anticorps antagoniste spécifique du  
5 récepteur FGF-R4 est un anticorps humain dont les parties variables de la chaîne lourde comprennent une séquence présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 76, 86, 96 ou 106.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 est un anticorps humain dont les parties variables de la chaîne légère  
10 comprennent une séquence présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 71, 81, 91 ou 101.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde comprenant une partie variable codée par une séquence nucléotidique présentant une identité d'au  
15 moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO 77, 87, 97 ou 107.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère comprenant une partie variable codée par une séquence nucléotidique présentant une identité d'au  
20 moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO 72, 82, 92 ou 102.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant des séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 71 et 76 ou les séquences nucléotidiques  
25 SEQ ID NO : 81 et 86 ou les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 91 et 96 ou les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 101 et 106.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences polypeptidiques SEQ ID  
NO : 72 et 77 ou les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 82 et 87 ou les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 92 et 97 ou les séquences polypeptidiques  
30 SEQ ID NO : 102 et 107.

De manière particulièrement préférée, un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 82 et 87.

44

Les séquences en acides aminés ainsi modifiées peuvent aussi être modifiées par des modifications post-traductionnelles au cours de la production dans la cellule mammifère. En particulier l'emploi de lignées stables déficientes dans la biosynthèse du fucose peut permettre de produire des anticorps monoclonaux dont le N-glycan du

5 Fc (position N297) est dépourvu partiellement ou totalement de fucose et permet d'augmenter l'effet effecteur ADCC ( Kanda *et al.*, 2006, *Biotechnol. Bioeng.* 94 :680-688 et Ripka *et al.*, 1986 *Arch Biochem Bioph* 249 : 533-545).

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'antagoniste spécifique de FGF-R4

10 est un anticorps conjugué.

Les anticorps peuvent être conjugués à un agent cytotoxique. Le terme « agent cytotoxique » désigne ici une substance qui réduit ou bloque la fonction, ou la croissance, des cellules, ou cause la destruction des cellules.

15 Dans un mode de réalisation, l'anticorps ou un fragment de liaison de celui-ci peut-être conjugué à un médicament, tel qu'un maytansinoïde, pour former un « pro-médicament » ayant une cytotoxicité envers les cellules exprimant l'antigène.

L'agent cytotoxique de la présente invention peut-être tout composé qui résulte en la mort d'une cellule, ou induit la mort d'une cellule, ou diminue de diverses façons la

20 viabilité des cellules. Les agents cytotoxiques préférés incluent, par exemple, des maytansinoïdes et analogues de maytansinoïdes, des taxoïdes, CC-1065 et analogues de CC-1065, dolastatine et analogue de dolastatine, définis ci-dessus. Ces agents cytotoxiques sont conjugués à des anticorps, fragments d'anticorps, équivalents fonctionnels, anticorps améliorés et leurs analogues comme décrits dans

25 la présente demande.

Les anticorps conjugués peuvent-être préparés par des méthodes *in vitro*. Afin de lier un médicament ou un pro-médicament à l'anticorps on utilise un groupe de liaison. Des groupes de liaison appropriés sont bien connus de l'homme du métier et incluent

30 notamment les groupes disulfides, les groupes thioéther, les groupes acides labiles, les groupes photolabiles, les groupes peptidases labiles et les groupes estérases labiles. Des groupes de liaison préférés sont les groupes disulfides et les groupes thioéther. Par exemple, un conjugué peut-être construit en utilisant une réaction

45

d'échange disulfide ou en formant un pont thioéther entre l'anticorps et le médicament ou pro-médicament.

Des composés tels que : le méthotraxétate, le daunorubicin, le vincristine, le vinblastine, le melphalan, le mitomycine C, le chlorambucil, le calichamicin, le tubulysin et les analogues du tubulysin, le duocarmycine et les analogues du duocarmycine, le dolastatin et les analogues du dolastatin sont également appropriés pour la préparation de conjugués de la présente invention. Les molécules peuvent aussi être liées aux molécules d'anticorps par une molécule intermédiaire telle que la sérum albumine. La doxorubicine et les composés de doxorubicine, comme décrits par exemple dans la demande de brevet US 09/740991, peuvent aussi être des agents cytotoxiques utiles.

Les anticorps objet de la présente invention peuvent-être associés à une molécule ou un composé cytotoxique. Ils peuvent aussi être associés à un composé anti-angiogénique agissant sur d'autres voies de l'angiogenèse.

15

Par « cellules exprimant le FGF-R4 », on entend toute cellule eucaryote, notamment de mammifères et en particulier humaine, qui exprime un récepteur FGF-R4 sous sa forme native, sous une forme mutée. Le FGF-R4 peut également être sous sa forme entière ou sous une forme tronquée comprenant par exemple le domaine extra-cellulaire de FGR-R4, et en particulier les domaines D2-D3. Le FGF-R4 peut également être recombiné sous une forme chimérique.

Les composés de l'invention peuvent être formulés dans des compositions pharmaceutiques en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc. Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc., ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les pathologies visées peuvent être toutes les maladies liées à l'angiogenèse, tumorale ou non tumorale.

Les pathologies visées peuvent être le cancer (avec l'utilisation de l'invention comme inhibiteur de l'angiogenèse tumorale), notamment le cancer du foie, du colon, du sein,

- 5 ou du poumon, prostate, pancréas ou de la peau, ou encore des pathologies pour lesquelles une dérégulation de l'angiogenèse est décrite comme : la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou DMLA, les maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoarthrite, les colites, les ulcères ou toute maladie inflammatoire des intestins, l'athérosclérose ou encore dans le traitement de l'obésité.
- 10 Les anticorps anti-FGF-R4 peuvent également être utilisés pour traiter le cancer, notamment les hépatocarcinomes et autres cancers hépatiques, et le cancer du pancréas en tant qu'inhibiteur ayant une action directement sur la croissance tumorale.
- 15 La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples qui suivent.

#### Description des figures

- 20 **Figures 1A et 1B :** *In vitro* (Fig 1A) des cellules endothéliales humaines de type HUVEC sont capables de former un réseau de pseudotubules appelé angiogenèse. Ce réseau est stimulé par l'ajout de 1 ng/ml de FGF2. Cette induction peut être également obtenue par l'ajout de 10 ng/ml de FGF19, ligand spécifique de FGF-R4 alors que 10 ng/ml de FGF4 (ligand non activateur de FGF-R4) ne sont pas capables
- 25 de stimuler l'angiogenèse. De la même façon, *in vivo*, (Fig 1B) dans un modèle murin d'induction de l'angiogenèse au niveau d'implant d'éponge sur le dos de la souris, le FGF2 est capable d'induire le recrutement de néo-vaisseaux fonctionnels vers l'éponge se caractérisant par une augmentation du contenu en hémoglobine de ces éponges en comparaison du contrôle. Le FGF19 est capable également d'induire
- 30 cette angiogenèse au niveau de l'éponge.

**Figure 2A :** Carte du plasmide pXL4614 permettant l'expression de hFGFR4-Histag. (SEQ ID NO 40)

**Figure 2B :** Carte du plasmide pXL4613 permettant l'expression de hFGFR4-Streptag. (SEQ ID NO 69).

**Figure 3 :** Carte du plasmide pXL4615 permettant l'expression de hFGFR4(D2,D3)-Histag. (SEQ ID NO 42)

**Figure 4 :** Carte du plasmide pXL4621 permettant l'expression de mFGFR4-Histag. (SEQ ID NO 44)

**Figure 5 :** Carte du plasmide pXL4328 permettant l'expression de hFGFR1-Fc (de séquence SEQ ID NO 46)

**Figure 6 :** Carte du plasmide pXL4327 permettant l'expression de hFGFR2-Fc (de séquence SEQ ID NO 48)

**Figure 7 :** Des plaques ELISA sont recouvertes par les 4 récepteurs humains aux FGF. La capacité des anticorps anti-FGFR4 40-12 et 64-12 à reconnaître ces différents FGF-Rs est mesurée par dosage ELISA. Le clone 40-12 (histogramme noir) est spécifique de FGF-R4. Le clone 64-12 (histogramme gris) reconnaît en plus très faiblement le FGF-R3.

**Figures 8A et 8B :** L'anticorps antagoniste actif 40-12 et son contrôle inactif 64-12 n'ont pas d'effet propre sur l'angiogenèse basale. Par contre, à la dose de 30 µg/ml (200 nM environ), l'anticorps monoclonal anti-FGFR4 40-12 est capable d'inhiber l'angiogenèse de cellules HUVEC induite par le FGF2 alors que l'anticorps contrôle 64-12 n'en est pas capable (Fig 8A).

Du FGF2 marqué à l'aide d'un AlexaFluor® 488 nm est capable de se lier au FGF-R4 exprimé par des cellules 300-19 (histogramme blanc). Cette interaction peut être dissociée par du FGF2 non marqué (histogrammes noirs) ou par l'anticorps anti-FGFR4 40-12 (histogrammes gris foncés) alors que l'anticorps témoins 64-12 n'en n'est pas capable (histogrammes gris clairs) (Fig 8B).

**Figure 8C et 8D :** Effet des anticorps anti-FGFR4 issus des clones 8, 31, 33 et 36 à 10µg/ml sur l'angiogenèse *in vitro* induite par 3 ng/ml de FGF-2. Les clones 8 (Fig 8C)

48

et 31, 33 et 36 (Fig 8D) inhibent l'angiogenèse de cellules HUVEC induite par le FGF-2.

**Figures 9A et 9B :** Des cellules d'hépatocarcinomes humains Hep3b sont stimulées par du FGF19 à 30 ng/ml. Cette stimulation induit une signalisation cellulaire spécifique de FGF-R4 aboutissant à la synthèse des protéines cFos et JunB et à la phosphorylation de Erk1/2 observé par Western-blot (Fig 9A). Chaque bande est alors quantifiée. Cette quantification est représentée sous forme d'histogramme (Fig 9B). L'anticorps 40-12 à 100 µg/ml inhibe totalement l'induction de la signalisation cellulaire spécifique de FGF-R4 alors que l'anticorps contrôle n'a aucun effet. En effet, l'anticorps 40-12 bloque complètement la synthèse de JunB et de cFos ainsi que la phosphorylation de Erk1/2 induite par le FGF19 après une simulation de 3h.

**Figure 9C :** L'effet inhibiteur de l'anticorps anti-FGFR4 40-12 sur la phosphorylation de Erk1/2 induite dans les cellules Hep3b par le FGF-19 (30 ng/ml) est confirmée à l'aide de l'ELISA anti-phosphoERK1/2. L'anticorps 40-12 est aussi capable d'inhiber la phosphorylation de Erk1/2 dans les cellules Hep3b stimulées par du FGF-2 (1 ng/ml) ou par du sérum (SVF) à 10%.

**Figure 9D :** Pourcentage d'inhibition de la phosphorylation de Erk1/2 induite par le FGF-19 (30ng/ml) obtenue par ELISA sur cellules Hep3b à l'aide des anticorps issus des clones 8, 31, 33 et 36.

**Figures 10A et 10B :** La prolifération de cellules Hep3b peut être stimulée par l'ajout de sérum (Fig 10A) ou de FGF19 (Fig 10B). L'induction par le sérum est partiellement inhibée par l'anticorps 40-12 à 100 µg/ml alors que l'anticorps contrôle n'a pas d'effet (Fig 10A). La prolifération induite par le FGF19 est totalement bloquée par 10 µg/ml d'anticorps anti-FGFR4 40-12 alors qu'à cette même dose, l'anticorps contrôle n'en n'est pas capable (Fig 10B).

**Figures 11A à 11D :** L'anticorps anti-FGFR4 40-12 est capable de réduire le développement de tumeurs pancréatiques dans un modèle murin RipTag en inhibant l'angiogenèse tumorale : Le modèle Rip1-Tag2 est un modèle murin où des souris transgéniques expriment l'antigène T du SV40 dans les cellules β des îlots du pancréas produisant l'insuline (Hanahan D. Nature, 1985, 9-15:115-22.). Cet antigène

49

T est exprimé au cours du développement embryonnaire du pancréas jusqu'à 4 à 5 semaines de vie, sans effet apparent. Une partie des ilots pancréatiques exprimant l'antigène T progresse alors pendant les 5 semaines suivantes vers la formation d'ilots angiogéniques associés à une activation de la vasculature puis vers le développement de petites tumeurs de type adénome. Quelques semaines plus tard quelques adénomes se développent pour former des carcinomes invasifs (Fig.11A). Ces souris Rip1-Tag2 sont traitées par voie sous-cutanée une fois par semaine entre les semaines 10 et 13 à la dose de 25 mg/kg à l'aide de l'anticorps 40-12 ou de l'anticorps contrôle. Après 13 semaines, les souris sont sacrifiées. Le volume tumoral ainsi que le nombre de tumeurs par pancréas et la densité vasculaire sont déterminés. Le traitement par l'anticorps anti-FGFR4 40-12 permet de réduire significativement le volume tumoral de 55% alors que l'anticorps témoins ne présente aucun effet (Fig. 11B). L'anticorps 40-12 permet également de réduire de 34% le nombre de tumeurs par pancréas en comparaison du témoin (Fig. 11C). Cette réduction du volume tumoral est accompagnée par une réduction de la densité vasculaire, que ce soit au niveau du nombre de vaisseaux petits, moyens ou larges (Fig. 11D).

**Figure 12 :** La capacité des anticorps 40-12 et 64-12 à reconnaître le domaine extracellulaire complet du FGF-R4 humain ou murin ainsi que le domaine extracellulaire du FGF-R4 amputé de son domaine D1 est mesuré par ELISA. Le clone 40-12 est capable de se lier aussi bien avec les 3 constructions de FGF-R4 alors que le clone 64-12 reconnaît moins bien la forme murine du FGF-R4.

**Figure 13A à 13C :** L'effet antagoniste de l'anticorps anti-FGFR4 clone 40-12 sur la liaison FGF2/FGF-R4 est mesuré par des expériences de compétition de liaison avec du FGF2 marqué à l'aide d'un AlexaFluor® 488 nm. Le clone 40-12 est capable de bloquer la liaison du FGF2 humain (Fig. 13A) , murin (Fig. 13B) et de rat (Fig. 13C) sur des cellules 300-19 murines transfectées à l'aide d'ADNc codant pour les formes humaines, murines ou de rat du récepteur FGF-R4, et ce, avec la même efficacité (3500, 4110 et 3940 ng/ml soit 23, 27 et 26 nM pour les complexes humains, murins ou de rat respectivement).

Figure 14A : Carte du plasmide pXL4794 permettant l'expression de hFGFR4\_D1 : Fc

50

Figure 14B : Séquence en acides aminés de la protéine hFGFR4\_D1 : Fc sécrétée dans la lignée HEK293 transfectée avec le plasmide pXL4794

- 5 Figure 15A : Carte du plasmide pXL4796 permettant l'expression de hFGFR4\_D2 : Fc

Figure 15B : Séquence en acides aminés de la protéine hFGFR4\_D2 : Fc sécrétée dans la lignée HEK293 transfectée avec le plasmide pXL4796

- 10 Figure 16A : Carte du plasmide pXL4799 permettant l'expression de hFGFR4\_D3 : Fc.

Figure 16B : Séquence en acides aminés de la protéine hFGFR4\_D3 : Fc sécrétée dans la lignée HEK293 transfectée avec le plasmide pXL4799

15

#### EXEMPLES :

- 20 **Exemple 1 : Mise en évidence du rôle de FGF-R4 dans le contrôle de l'angiogenèse**

Afin de démontrer le rôle de FGF-R4 dans le contrôle de l'angiogenèse, des expériences d'angiogenèse *in vitro* ont été réalisées avec des cellules endothéliales humaines de type HUVEC stimulées avec plusieurs FGF. Le FGF2, ligand activateur de la plupart des récepteurs aux FGF. Le FGF19, ligand activateur spécifique de FGF-R4 et le FGF4 ligand non activateur de FGF-R4.

25 Pour ce faire, des gels ont été préparés en distribuant dans chaque puits de chamberslide (Biocoat Cellware collagen, Type I, 8-well culturesides : Becton dickinson 354630), 160µl de matrigel dilué au 1/6 (Growth factor reduced Matrigel : Becton dickinson 356230) dans du collagène (rat Tail collagene, type I : Becton dickinson 354236). Les gels sont maintenus pendant 1 heure à 37°C pour permettre leur polymérisation. Ensuite, les cellules endothéliales veineuses humaines (HUVEC réf : C-12200 – Promocell) ont étéensemencées à  $15.10^3$  cellules/puits dans 400 µl de milieu EBM (Clonetics C3121) + 2 % FBS + hEGF 10µg/ml. Ce protocole peut être adapté à des plaques 96 puits : 60µl par puits de plaques 96 puits (Biocoat collagenI

cellware, Becton Dickinson 354407). La matrice est préparée en mélangeant 1/3 de matrigel, 1mg/ml final de collagène, NaOH (0.026x le volume de collagène en µl), PBS 1x, le volume est ensuite ajusté par de l'eau. Les cellules endothéliales sont stimulées avec 1 ng/ml de FGF2 (R&D, 133-FB-025) ou 10 ng/ml de FGF4 (R&D, 235-F4-025) ou de FGF19 (R&D, 969-FG-025) pendant 24h à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Après 24 heures, la longueur du réseau de microtubules formés est mesurée à l'aide d'un système d'analyse d'images assisté par ordinateur (Imagenia Biocom, Courtaboeuf, France) et la longueur totale des pseudo-tubules dans chaque puits est déterminée. La moyenne de la longueur totale du réseau de microcapillaire est calculée en µm pour chaque condition correspondant à la moyenne sur 6 réplicats.

La stimulation par du FGF2 ou du FGF19 permet l'induction de la formation de nouveaux tubules alors que le FGF4 n'a pas d'effet (Fig. 1A). Ces résultats montrent que l'activation spécifique de FGF-R4 permet d'induire la formation de néo-vaisseaux et donc de conclure que FGF-R4 contrôle l'angiogenèse *in vitro*.

La corrélation *in vivo* avec les données *in vitro* a été obtenue à l'aide du modèle d'induction de l'angiogenèse *in vivo* dans des implants de cellulose chez la souris. Ce modèle est une adaptation du modèle décrit par Andrade *et al.* (*Microvascular Research*, 1997, 54, 253-61).

Les animaux, souris blanches BALB/c J consanguines sont anesthésiées avec un mélange Xylazine (Rompun®, 10mg/kg)/ Kétamine (Imalgène 1000, 100mg/kg) par voie intra péritonéale. Le dos de l'animal est rasé et désinfecté à l'Héxomédine®. Une poche d'air est créée en sous cutané sur le dos de la souris par injection de 5 ml d'air stérile. Une incision d'environ 2 cm, sur le haut du dos de l'animal est réalisée afin d'introduire un implant de cellulose stérile (disque de 1 cm de diamètre, 2 mm d'épaisseur, Cellspon® réf 0501) imprégné avec 50 µl de solution stérile contenant la protéine ou le produit à tester. L'incision est ensuite suturée et nettoyée à l'Héxomédine®. Les jours suivants la pose de l'implant, les souris ont reçu dans l'implant la protéine ou le produit par une injection à travers la peau (50 µl/implant/jour) sous anesthésie gazeuse (Isoflurane à 5 % (Aerrane®, Baxter).

Sept jours après la pose de l'éponge, les souris sont sacrifiées par une dose létale de Pentobarbital sodique (CEVA santé animale), administrée par voie intra-péritonéale. La peau est ensuite découpée, environ 1 cm autour de l'éponge en évitant la cicatrice

afin de dégager la peau et l'éponge. L'éponge est ensuite découpée en plusieurs morceaux et placée dans un tube Ribolyser® contenant 1 ml de tampon de lyse (Cell Death Detection ELISA, Roche). Les tubes sont agités 4 fois consécutives, durant 20 sec, force 4, au broyeur cellulaire (FastPrep® FP 120). Les tubes sont ensuite

5 centrifugés 10 min à 2000 g à 20°C et les surnageants sont congelés à -20°C en attendant le dosage Hémoglobine.

Le jour du dosage, les tubes sont à nouveau centrifugés après décongélation et la concentration d'hémoglobine est mesurée avec le réactif de Drabkin (Sigma, volume à volume) par lecture au spectrophotomètre à 405 nm contre une gamme étalon

10 d'hémoglobine bovine (Sigma). La concentration d'hémoglobine dans chaque échantillon est exprimée en mg/ml d'après la régression polynomiale réalisée à partir de la gamme. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ( $\pm$  sem) pour chaque groupe. Les différences entre les groupes sont testées avec une ANOVA suivie d'un test de Dunnett sur la racine carrée des valeurs.

15 Dans ce modèle, le FGF19 à 50 ng par site et 5 ré-injections est capable d'induire significativement la colonisation de l'éponge par des vaisseaux matures nouvellement formés avec la même efficacité que le FGF2 à 5 ng par site. La présence de vaisseaux sanguins fonctionnels dans l'éponge est mise en évidence par la présence d'hémoglobine (Fig. 1B). Ces résultats montrent que l'activation spécifique de FGF-

20 R4 permet le recrutement de vaisseaux sanguins fonctionnels indiquant que FGF-R4 contrôle également l'angiogenèse *in vivo*.

#### **Exemple 2 : Description des protéines FGFR utilisées comme immunogène et antigène.**

25 Des récepteurs aux facteurs de croissance FGFR et en particulier leurs domaines extracellulaires des FGF-R1, FGF-R2, FGF-R3, FGF-R4 sont fusionnés à un tag (Histag) ou au domaine Fc d'immunoglobuline.

Le cDNA codant pour le domaine extracellulaire de FGF-R4 humain, correspond à la protéine décrite dans SwissProt FGF-R4\_HUMAN position 1-365 avec la mutation

30 L136P. Il a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pXL4614 représenté sur la figure 2 afin d'exprimer une protéine contenant un Histag en position C-terminale dans le domaine extracellulaire.

Les protéines nommées hFGFR4-Histag, de séquence SEQ ID NO 40 ont été produites par transfection transitoire dans la lignée HEK293 EBNA (Invitrogen) à

53

l'aide du plasmide pXL4614 et des plasmides accessoires pXL4544 et pXL4551 permettant l'expression de deux enzymes de glycosylation des N-glycans, i.e. la  $\alpha$ -2,3-sialyltransférase et la  $\beta$ -1,4-galactosyltransférase comme cela a été décrit dans la demande WO2008/065543.

5

La protéine hFGFR4-Histag exprimée dans le surnageant de culture des cellules HEK293 EBNA a été purifiée par chromatographie sur colonne sépharose Ni-chelating (Amersham Biosciences ; réf. 17-0575-01) et élution en tampon imidazole puis formulée en tampon PBS (Invitrogen ; réf. 14190-094). L'analyse de la composition en monosaccharides et la quantification des acides sialiques des N-glycans comme décrit par Saddic *et al.* 2002. (Methods Mol. Biol. 194:23-36 and Anumula *et al.* 1998. Glycobiology 8:685-694) ont permis de démontrer que la protéine était très largement sialylée (91 %). Par conséquent la protéine avait toutes les caractéristiques pour avoir des propriétés pharmacocinétiques suffisantes.

10

De façon comparable la protéine hFGFR4-Streptag (SEQ ID NO 69) a été purifiée par chromatographie sur colonne Strep-Tactin Superflow (IBA ; réf. 2-1206) et élution en tampon desthiobiotine puis formulée en tampon PBS.

La protéine hFGFR4(D2,D3)-Histag correspond à la séquence SEQ ID NO 42. Le cDNA a été cloné dans le plasmide d'expression eucaryote pXL4615 représenté sur la figure 3 et la protéine a été produite et purifiée dans des conditions comparables à la protéine hFGFR4-Histag.

20

Le cDNA codant pour la protéine mFGFR4-Histag (SEQ ID NO 43) a été cloné dans le plasmide d'expression eucaryote pXL4621 représenté sur la figure 4 et la protéine a été produite et purifiée dans des conditions comparables à la protéine hFGFR4-Histag.

25

La protéine hFGFR1-Fc, (SEQ ID NO 46) contient le domaine extracellulaire de FGF-R1 IIIc humain fusionné en C-terminal au domaine Fc de l'IgG1 humain. Le cDNA a été cloné dans le plasmide d'expression eucaryote pXL4728 représenté sur la figure 5 et la protéine a été produite dans des conditions comparables à la protéine hFGFR4-Histag puis purifiée par chromatographie sur colonne d'affinité Sépharose protéine G (Amersham Biosciences) et élution en tampon 100 mM glycine/HCl pH 2,7 puis formulée en tampon PBS.

30

La protéine hFGFR2-Fc, de séquence SEQ ID NO 48, contient le domaine extracellulaire de FGF-R2 IIIc humain fusionné en C-terminal au domaine Fc de l'IgG1 humain. Le cDNA a été cloné dans le plasmide d'expression eucaryote pXL4327 représentée sur la figure 6 et la protéine a été produite puis purifiée dans des conditions comparables à la protéine hFGFR1-Fc.

La protéine hFGFR3-Fc est une protéine fusionnant le domaine extracellulaire de FGF-R3 IIIc humain au domaine Fc de l'IgG1 humain a été obtenue de R&D System (réf : 760-FR).

La protéine hFGFR4-Fc est une protéine fusionnant le domaine extracellulaire de FGF-R4 humain au domaine Fc de l'IgG1 humain a été obtenue de R&D Systems (réf : 685-FR).

Différents sous-domaines de la partie extracellulaire de protéine hFGFR4 ont été fusionnés au domaine Fc de l'IgG1 humain. Le sous-domaine D1 est contenu dans la construction SABVA4794 (SEQ ID NO 112 et Fig 14A et 14B). Le sous-domaine D2 est contenu dans la construction SABVA4796 (SEQ ID NO 114 et Fig 15A et 15B). Le sous-domaine D3 est contenu dans la construction SABVA4799 (SEQ ID NO 116 et Fig 16A et 16B). Ces trois sous-domaines s'étendent respectivement des positions 1 à 179 pour SABVA4794, 1 à 32 plus 145 à 242 pour le SABVA4796 et 1 à 32 plus 228 à 360 pour le SABVA4799 (positions décrites dans SwissProt FGF-R4\_HUMAN). Ces protéines ont été produites à partir des plasmides pXL4794 (séquence codante SEQ ID NO 111), pXL4796 (séquence codante SEQ ID NO 113) et pXL4799 (séquence codante SEQ ID NO 115) dans des conditions comparables à la protéine FGFR1-Fc.

### Exemple 3 : Génération et criblage des anticorps monoclonaux anti-FGF-R4

#### A – Anticorps obtenus par immunisation

Les anticorps monoclonaux ont été obtenus par immunisation avec l'immunogène hFGFR4-Histag chez cinq souris BALB/cJ (Charles River), âgées de 6 à 8 semaines immunisées avec chacune un total de 24 µg de hFGFR4-Histag par la méthode RIMMS décrite par Kilpatrick *et al.* (1997. Hybridoma 16 : 381389) et le protocole de fusion décrit dans ClonaCell™- HY Hybridoma Cloning Kit (StemCell Technologies ; réf 03800).

Deux jours après la dernière injection, les souris ont été sacrifiées et les nodules lymphatiques ont été fusionnés avec les cellules de myélome P3X63-AG8.653 (ATCC, CRL-1580) dans un rapport 5:1 en présence de Polyéthylène Glycol (ClonaCell™-HY réf. 03806). La suspension cellulaire a été répartie aseptiquement

5 dans des boîtes de Petri incubées à 37°C en présence de 5 % CO<sub>2</sub>. Les colonies apparues après 12 jours d'incubation ont été isolées et mises en culture dans du milieu E (ClonaCell™-HY; ref. 03805) dans des boîtes 96 puits.

Le criblage primaire d'anticorps monoclonaux obtenus par immunisation avec hFGFR4-Histag a été réalisé par dosage ELISA en utilisant comme antigène de

10 capture hFGFR4 -Streptag. L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Les surnageants de culture d'hybridomes ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de lapin anti-souris IgG conjugué à la peroxydase (Sigma ; réf. A9044-dilution au 1:50000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Interchim ; réf UP664780) et les

15 mesures avec le lecteur de plaques à 450 nm. Parmi les 444 hybridomes testés, 129 étaient positifs par dosage ELISA avec l'antigène hFGFR4-Streptag dont 120 hybridomes étaient aussi positifs avec la protéine dimère hFGFR4-Fc.

Un criblage secondaire a été réalisé pour sélectionner uniquement les anticorps

20 spécifiques au FGF-R4 par dosage ELISA en utilisant comme antigène de capture la protéine hFGFR4-Streptag, puis avec les protéines hFGFR1-Fc, hFGFR2-Fc et hFGFR3-Fc décrites dans l'exemple 2. L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Les surnageants de culture d'hybridomes ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de lapin

25 anti-souris IgG conjugué à la peroxydase (Sigma ; réf. A9044-dilution au 1:50000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Interchim ; réf UP664780) et les mesures avec le lecteur de plaques à 450 nm.

Parmi les 129 hybridomes testés positifs par dosage ELISA avec l'antigène, 84 hybridomes étaient positifs avec hFGFR4-Streptag et n'avaient pas d'affinité ni pour

30 hFGFR1-Fc, ni pour hFGFR2-Fc ni pour hFGFR3-Fc. En fonction de leur croissance et de leur morphologie, 39 hybridomes ont été conservés. Leur isotype a été déterminé à l'aide du kit SEROTEC (réf. MMT1) ; 95 % étaient des IgG1.

Un criblage tertiaire a été réalisé sur un test de prolifération de cellules modifiées Baf/3, induite par FGF2 afin de caractériser l'inhibition par les anticorps anti-FGFR4.

Les hybridomes murins exprimant les anticorps anti-FGFR4 antagonistes ont été clonés par dilution-limite. A partir des cellules d'hybridomes cultivées en phase exponentielle, la séquence codante (cDNA) a été déterminée après extraction de l'ARNm à l'aide du kit Oligotex (Qiagen ; réf 72022) ; obtention et amplification du cDNA par la méthode RACE-RT avec le kit Gene Racer, la reverse transcriptase SuperScript III (Invitrogen ; réf L1500) et les amorces (primers) décrites dans le tableau 2 ci-dessous ; amplification des fragments cDNA à l'aide de la polymérase Phusion (Finnzymes ; réf. F-530S), les amorces (primers) et les conditions de température décrites dans le tableau 2. Les fragments amplifiés contenant les parties codantes pour VH (partie variable de la chaîne lourde HC) ou VL (partie variable de la chaîne légère LC) ont été clonés dans le vecteur pGEM-T Easy de Promega ; réf A137A), les inserts des plasmides obtenus ont été séquencés, de sorte que la séquence codante de chaque domaine variable ait été analysée dans les sens 5'-3' et 3'-5' sur au moins 6 plasmides correspondant aux anticorps anti-FGFR4 40-12 et anti-FGFR4 64-12. Les analyses de séquence, contigs et alignements ont été réalisées à l'aide du logiciel disponible sur Vector NTI (Invitrogen).

Les plasmides contenant les séquences consensus codant pour les parties variables des anticorps anti-FGFR4 ont été conservés. Le plasmide pXL4691 contient la séquence codant pour la VH de séquence SEQ ID NO 5 de l'anticorps anti-FGFR4 40-12, et le plasmide pXL4693 contient la séquence codant pour la VH de séquence SEQ ID NO 19 de l'anticorps anti-FGFR4 64-12 comme présenté dans le tableau 2 ci-dessous.

Le plasmide pXL4690 contient la séquence nucléotidique SEQ ID NO 7 codant pour la VL de séquence SEQ ID NO 8 de l'anticorps anti-FGFR4 40-12, et le plasmide pXL4692 contient la séquence nucléotidique SEQ ID NO 21 codant pour la VL de séquence SEQ ID NO 22 de l'anticorps anti-FGFR4 64-12 comme présenté dans le tableau 2 ci-dessous.

30

Tableau 2 - Conditions opératoires et analyse des réactions de transcriptase reverse et PCR -Identification des plasmides pXL4690 à pXL4693.

| Anti-FGFR4                                                              | 40-12                                                                                    | 64-12                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Réaction RT<br>Température<br>Primers                                   | 55°C<br>SEQ ID NO 64 (HC)<br>SEQ ID NO 65 (LC)                                           | 55°C<br>SEQ ID NO 64 (HC)<br>SEQ ID NO 66 & SEQ ID NO 67 LC)                            |
| Primer 5'-GeneRacer<br>(SEQ ID NO 63)                                   | 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'                                                            |                                                                                         |
| Primer 3'- interne au<br>hinge murin (SEQ ID<br>NO 64)                  | 5'-TATGCAAGGCTTACAACCACA-3'                                                              |                                                                                         |
| Primer 3'- interne au Ck<br>murin (SEQ ID NO 65)                        | 5'-CTCATTCTGTT<br>GAAGCTCTT GAC-3'                                                       |                                                                                         |
| Primers 3'- internes à<br>Cλ murin<br>(SEQ ID NO 66 et<br>SEQ ID NO 67) |                                                                                          | 5'- ACACTCAGCACGGG<br>ACAACTCTTCTC-3'<br>5'- ACACTCTGCAGGAG<br>ACAGACTCTTTTC-3'         |
| PCR de HC:<br>Température<br>Primers                                    | 55°C<br>SEQ ID NO 63 - SEQ ID<br>NO 64                                                   | 55°C<br>SEQ ID NO 63 – SEQ ID NO<br>64                                                  |
| Séquence des produits<br>PCR clonés (VH)                                | 9 clones ont la même<br>séquence VH et une<br>séquence CH1 identique à<br>celle du mCH1- | 6 clones ont la même<br>séquence VH et une séquence<br>CH1 identique à celle du<br>mCH1 |
| Plasmide contenant VH                                                   | pXL4691                                                                                  | pXL4693                                                                                 |
| PCR de LC :<br>Température<br>Primers                                   | 55°C<br>SEQ ID NO 63 – SEQ ID<br>NO 65                                                   | 55°C<br>SEQ ID NO 63 – SEQ ID NO<br>66 & 67                                             |
| Séquence des produits<br>PCR clonés (VL)                                | 11 clones ont la même<br>séquence VL et une<br>séquence Ck identique à<br>mCk            | 6 clones ont la même<br>séquence VL et une séquence<br>Cλ identique à mCλ               |
| Plasmide contenant VL                                                   | pXL4690                                                                                  | pXL4692                                                                                 |

Les séquences en acides aminés des parties variables légères et lourdes respectivement des anticorps anti-FGFR4 64-12 et anti-FGFR4 40-12 sont différentes. Les numéros des séquences utilisées, obtenues et déduites sont indiqués dans le tableau 7.

Les anticorps 40-12 et 64-12 ont été produits en flasques T500. Le surnageant de culture a été récolté après 7 jours. Les anticorps anti-FGFR4 ont été purifiés par affinité sur protéine G puis dialysés contre du PBS filtrés stériles et conservés à 4°C.

Les anticorps antagonistes purifiés ont un  $K_D$  de  $6.5 \times 10^{-9}$  M (anti-FGFR4 40-12) et  $5.75 \times 10^{-8}$  M (anti-FGFR4 64-12).

#### B – Anticorps sélectionné à l'aide de la méthode phage display

Le criblage primaire d'anticorps monoclonaux obtenus par phage display avec hFGFR4-Histag a été réalisé par dosage ELISA en utilisant comme antigène de capture hFGFR4-Histag. L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-2 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Les surnageants de culture d'E. coli infectées par les phages ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de souris antiM13 conjugué à la peroxydase (GE Healthcare ; réf. 27-9421-01, dilution au 1:5000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Interchim ; réf. UP664780) et les mesures de densité optique (O.D.) effectuées à 450 nm.

Un criblage secondaire a été réalisé pour sélectionner uniquement les anticorps spécifiques au FGF-R4 par dosage ELISA en utilisant comme antigène de capture la protéine hFGFR4-Histag, puis avec les protéines hFGFR1-Fc, hFGFR2-Fc et hFGFR3-Fc décrites dans l'exemple 2. L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-2 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Les surnageants de culture d'E. coli infectées par les phages ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de souris antiM13 conjugué à la peroxydase (GE Healthcare ; réf. 27-9421-01, dilution au 1:5000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Interchim ; réf. UP664780) et les mesures de densité optique (O.D.) effectuées à 450 nm.

Les clones spécifiques au FGF-R4 sélectionnés ont été séquencés et reclés dans un vecteur d'expression pour transfection transitoire de cellules HEK293.

5 Pour cela, dans une première étape, les régions codant le Fab, c'est à dire la chaîne légère de l'anticorps, un site de liaison de ribosome bactérien, et la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps, sont extraites du phagemide par restriction et insérées dans un plasmide d'expression d'IgG pour cellules de mammifères, en aval d'une

10 séquence signal d'anticorps eucaryote et en amont de la région constante d'une chaîne lourde d'IgG1 humaine. Dans une seconde étape, la région contenant le site de liaison du ribosome bactérien et le peptide signal bactérien de la chaîne lourde est échangée contre une séquence IRES et une séquence signal eucaryote. Les IgG sont exprimées par transfection transitoire de cellules HEK293. Ce processus est décrit en

15 détail dans *T. Jostock et al. , Journal of Immunological Methods 289 (2004) 65-80*

Un exemple de séquence de région constante d'IgG1 humaine qui peut être utilisée dans la présente invention est la séquence SEQ ID NO 117.

Un criblage tertiaire a été réalisé sur un test de prolifération de cellules modifiées

15 BaF/3, induite par FGF2 et décrite dans l'exemple 4 afin de caractériser l'inhibition par les anticorps anti-FGFR4 en utilisant les surnageants de cultures de cellules HEK293 transfectées transitoirement par les vecteurs d'expression des anticorps. Ce criblage a permis d'identifier les anticorps des clones 8, 31, 33 et 36. Les séquences correspondantes sont décrites dans le tableau 7.

20

#### **Exemple 4 : Etablissement de la lignée clonale murine BaF/3 FGF-R4-hMpl et protocole de prolifération cellulaire**

La partie extracellulaire et transmembranaire du FGF-R4 a été clonée en fusion

25 traductionnelle avec le domaine intracellulaire du hMpl dans un vecteur pEF6/V5-His A muté afin d'obtenir la présence en 5' du tag HA devant le récepteur chimère FGF-R4-hMpl.

#### Construction du pEF6A muté

30 Le vecteur pEF6/V5-His A (Invitrogen, référence V961-20) a été amélioré afin d'intégrer le MCS (multi Clonage Sites) associé au tag HA placé sous le peptide signal de l'IgGk du pDisplay (Invitrogen, référence V660-20). Pour se faire, le MCS associé au tag HA et à son peptide signal ont été amplifiés par PCR entre les amorces sens de séquence SEQ ID NO : 51 et reverse de séquence SEQ ID NO : 52

permettant d'insérer les sites de restriction KpnI en 5' et XbaI en 3'. Le fragment PCR a été digéré par les enzymes KpnI et XbaI puis cloné dans le vecteur pEF6/V5-His A ouverts par les mêmes enzymes. Enfin, le premier site BamHI du MCS a été remplacé par le site BsrGI en digérant vecteur nouvellement formé par les enzymes KpnI et SpeI et en insérant entre ces sites les amorces de séquences SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 hybridées entre elles et contenant le site enzymatique BsrGI. Le vecteur obtenu a été nommé : pEF6mut-HA.

#### Construction du vecteur pEF6mut-HA-FGF-R4-hMpl

- 10 Le domaine intracellulaire du Mpl a été amplifié dans un vecteur pEF6/V5-His TOPO (Invitrogen, référence K9610-20) entre les amorces sens de séquence SEQ ID NO : 55 permettant l'insertion du site de digestion SacI et reverse de séquence SEQ ID NO : 56 appelée communément revBGH. Les fragments PCR générés ont ensuite été digérés par les enzymes SacI et NotI.
- 15 Le domaine extracellulaire et transmembranaire du FGF-R4 a été amplifié à l'aide du couple d'amorces (sens : séquence SEQ ID NO : 57 ; reverse : séquence SEQ ID NO : 58). Ces amorces permettent l'insertion des sites enzymatiques BamHI en 5' et SacI en 3'. Le fragment PCR obtenu a alors été digéré par les enzymes BamHI et SacI.
- 20 Les amplifications d'ADN codant pour le hMpl et pour le FGF-R4 ont ensuite été clonées simultanément dans le vecteur pEF6mut-HA ouvert BamHI – NotI. La construction qui en résulte a été nommée « pEF6mut-HA FGF-R4 $\alpha$ IIIc-hMpl2 ». Cette construction a ensuite été améliorée par mutagenèse dirigée afin de changer le domaine transmembranaire du FGF-R4 (séquence protéique SEQ ID NO : 59) pour la
- 25 séquence SEQ ID NO : 60. Pour se faire, le kit "QuickChange® Site-directed mutagenesis kit" (Clontech, référence 200518) a été utilisé avec les amorces sens de séquence SEQ ID NO : 61 et reverse de séquence SEQ ID NO : 62. La nouvelle construction chimère obtenue a été appelée pEF6mut-HA FGF-R4 $\alpha$ IIICmut-hMpl2.
- 30 Création d'une lignée stable par transfection de la lignée murine BaF/3 avec la construction FGF- R4 $\alpha$ IIICmut-hMpl2:

La construction « pEF6mut-HA FGF-R4 $\alpha$ IIICmut-hMpl2 » a été introduite de façon stable par électroporation dans le génome des cellules murines BaF/3. La lignée

obtenue a été sélectionnée en présence de FGF2 à 20 ng/ml (R&D, référence 234-FSE-025) et d'héparine à 100 ng/ml (Sigma, référence H3149). La lignée transfectée et sélectionnée est alors de type clonal.

5 Protocole de prolifération cellulaire avec la lignée cellulaire BaF/3 FGFR4-hMpl :

- Les cellules BaF/3 FGFR4-hMpl ont été cultivées et entretenues dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen ; réf. 32404-014) complet (10 % SVF (Hyclone; réf. SH30070.03), Glutamine à 2mM, MEM Non Essential Amino Acid 1x (Gibco, réf 11140-035), MEM Sodium Pyruvate 1x (Gibco, réf 11360-039)) , supplémenté en
- 10 FGF2 à 20ng/ml (R&D System, ref 234-FSE) et héparine à 3ng/ml (Sigma, ref H3149).. La veille, les cellules sontensemencées à  $0.4 \cdot 10^6$  cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 complet supplémenté en FGF2 à 20ng/ml et en héparine à 3ng/ml. Le lendemain, 50µl de suspension cellulaire BaF/3 FGFR4-hMpl dans du milieu RPMI 1640 complet supplémenté en FGF2 à 20ng/ml et en héparine à 3ng/ml à  $0.2 \cdot 10^6$
- 15 cellules/ml ont été dispensés en plaque 96 puits (Porvair, réf 214006) suivi de 50µl de surnageant d'hybridome contenant l'anticorps à tester. Les plaques ont ensuite été placées à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> pendant 24 à 30 h. Pour la lecture de la prolifération cellulaire, la quantité d'ATP a été quantifiée par l'ajout de 100 µl de Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, ref G7571) et la luminescence a été lue à
- 20 l'aide d'un luminomètre.

Les clones présentant dans ce test un signal 50 % plus faible que celui du milieu RPMI 1640 complet contenant les additifs FGF2 à 20 ng/ml et héparine à 3 ng/ml ont été retenus.

- 25 Lorsque les anticorps anti-FGFR4, spécifiques de FGF-R4 ont été incubés avec les cellules Baf/3-FGFR4-hMpl et avec les additifs suivants FGF2 à 20 ng/ml et l'héparine à 3 ng/ml, un effet antagoniste sur la prolifération cellulaire a été observé. Parmi les 39 hybridomes testés, 14 sont capable d'inhiber la prolifération cellulaire, induite par le FGF, des cellules Baf/3-FGFR4-hMpl en présence de FGF2.
- 30 Il a été montré par ELISA (Fig 12) que les anticorps anti-FGFR4 antagonistes 40-12 et 64-12 étaient affins pour les protéines murines mFGFR4 et humaines hFGFR4 (D2, D3).

Enfin un dernier criblage a été réalisé par Surface Plasmon Resonance (BIAcore 2000) pour déterminer les constantes d'affinité des anticorps anti-FGFR4. L'interaction entre la protéine FGF-R4 et l'anticorps anti-FGFR4 présent dans le surnageant de culture de l'hybridome a été analysée après avoir fixé l'anticorps anti-FGFR4 à un anticorps anti-Fc lui-même fixé sur la chips CM. Les mesures de cinétiques sont réalisées selon le protocole de Canziani *et al* 2004. Anal. Biochem. 325 : 301-307.

Deux anticorps parmi ceux ayant des constantes d'affinité de  $10^{-8}$  à  $10^{-9}$  M et des vitesses de dissociation de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  s<sup>-1</sup> ont été sélectionnés. Les caractéristiques de ces anticorps sont décrites dans le tableau 1 ci-dessous.

La méthode de référence utilisée pour la détermination du K<sub>D</sub> est le Surface Plasmon Resonance (BIAcore).

Tableau 1A : Constantes d'affinité et d'association/dissociation des anticorps anti-FGFR4 antagonistes purifiés 40-12 et 64-12

| Anti-FGFR4 | k <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> ) | k <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> ) | K <sub>D</sub> (M) |
|------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| 40-12      | 1.94E+05                                            | 1.26E-03                            | 6.50E-09           |
| 64-12      | 1.05E+04                                            | 6.02E-04                            | 5.75E-08           |

Tableau 1B : Paramètres cinétiques de liaison des anticorps anti-FGFR4 8, 31, 33 et 36 mesurés par Surface Plasmon Resonance (BIAcore 3000) :

|          | sur h-FGFR4-Histag                     |                         |          | sur m-FGFR4-Histag                     |                         |          |
|----------|----------------------------------------|-------------------------|----------|----------------------------------------|-------------------------|----------|
|          | Kon (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Koff (s <sup>-1</sup> ) | KD (M)   | Kon (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Koff (s <sup>-1</sup> ) | KD (M)   |
| Clone 8  | 8,93E+05                               | 2,92E-04                | 3,27E-10 | 1,20E+06                               | 1,36E-04                | 1,15E-10 |
| Clone 31 | 6,48E+05                               | 9,80E-04                | 1,52E-09 | 9,14E+05                               | 1,80E-03                | 1,97E-09 |
| Clone 33 | 8,05E+05                               | 6,17E-04                | 7,71E-10 | 1,01E+06                               | 7,04E-04                | 6,92E-10 |
| Clone 36 | 2,44E+05                               | 6,31E-04                | 2,62E-09 | 3,30E+05                               | 7,52E-04                | 2,28E-09 |

63

**Exemple 5 : Spécificité des anticorps anti-FGFR4**

A- Spécificité de l'anticorps anti-FGFR4 40-12 pour le FGF-R4

La spécificité de chaque anticorps est établie par ELISA selon le protocole décrit dans l'exemple 4. De cette façon, on observe la capacité de chaque anticorps à se lier à chaque FGF-R. Cette expérience montre clairement que l'anticorps 40-12 ne reconnaît que FGF-R4 et est donc spécifique de FGF-R4. L'anticorps 64-12 est capable de se lier principalement à FGF-R4 mais également faiblement à FGF-R3 (Fig. 7).

B - Spécificité des anticorps anti-FGFR4 8, 31, 33 et 36 pour le FGF-R4

La spécificité de chaque anticorps est établie par ELISA selon le protocole suivant : des suspensions de phages présentant à leur surface les anticorps au format Fab sont générés par infection de bactéries *E. coli*. Les antigènes de capture ont été fixés sur des boîtes Immulon-2 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Les suspensions de phages ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de souris anti-phage M13 conjugué à la peroxydase (GE Healthcare, réf. 27-9421-01, dilution au 1:5000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H2O2 (Interchim ; réf UP664780) et les mesures de densité optique (O.D.) effectuées à 450 nm. Le tableau 2 résume les résultats obtenus: De cette façon, on observe la capacité de chaque anticorps à se lier à chaque FGF-R. Cette expérience montre clairement que les anticorps 8, 31, 33, 36 ne reconnaissent que FGF-R4 et sont donc spécifiques de FGF-R4.

Tableau 2 : Spécificité des anticorps anti-FGF-R4 issus des clones 8, 31, 33 et 36 établie par ELISA (Signal = O.D., 450 nm)

|          | h-FGFR4(D2,D3)-histag | h-FGFR1-Fc | h-FGFR2-Fc | h-FGFR3-Fc |
|----------|-----------------------|------------|------------|------------|
| Clone 8  | 2,55                  | 0,05       | 0,00       | 0,00       |
| Clone 31 | 2,52                  | 0,00       | 0,00       | 0,01       |
| Clone 33 | 2,73                  | 0,00       | 0,00       | -0,01      |
| Clone 36 | 1,87                  | -0,01      | -0,01      | -0,02      |

64

**Exemple 6 : Effet antagoniste de l'anticorps 40-12 et des anticorps issus des clones 8, 31, 33, 36 sur l'angiogenèse (*in vitro*)**

Afin de déterminer l'activité biologique de l'anticorps monoclonal 40-12 anti-FGFR4 au cours de l'angiogenèse de cellules endothéliales humaines, des expériences d'angiogenèse *in vitro* ont été réalisées à l'aide de cellules HUVEC stimulées par du FGF2 en présence de l'anticorps 40-12 ou de l'anticorps témoins en doses croissantes de 1 à 30 µg/ml. (Fig 8A et 8B)

Dans ce cadre, l'anticorps monoclonal anti-FGFR4 antagoniste actif 40-12 est capable d'inhiber l'angiogenèse de cellules HUVEC induite par le FGF2, et ce, à la dose de 30 µg/ml ou 200 nM alors que l'anticorps témoin 64-12 n'a aucun effet. De plus, l'anticorps 40-12 n'a aucun effet propre sur l'angiogenèse basale.

Ces résultats indiquent qu'un anticorps antagoniste spécifique de FGF-R4 est capable d'inhiber l'angiogenèse.

Comme pour l'anticorps 40-12, les anticorps anti-FGFR4 des clones 8, 31, 33 et 36 issus du phage display ont été évalués quant à leur capacité d'inhiber l'angiogenèse de cellules endothéliales humaines de type HUVEC induite par le FGF-2. Ces 4 anticorps bloquent la stimulation de l'angiogenèse *in vitro* obtenue avec le FGF-2, et ce à la dose de 10 µg/ml (Fig. 8C et 8D).

**Exemple 7 : Effet antagoniste de l'anticorps 40-12 et des anticorps issus des clones 8, 31, 33, 36 sur des cellules d'hépatocarcinomes humains (*in vitro*)**

Afin de déterminer l'effet anti-tumoral de l'anticorps monoclonal anti-FGFR4 antagoniste 40-12, des expériences ont été réalisées sur des cellules d'hépatocarcinome humain Hep3b dont la prolifération et les voies de signalisation y aboutissant sont dépendantes du couple ligand-récepteur : FGF19/FGF-R4.

Premièrement, l'étude des voies de signalisation dépendantes de FGF-R4 et aboutissant à la prolifération des cellules Hep3b a été entreprise par Western-blot. Cette signalisation cellulaire passe par la néo-synthèse des protéines cFos et JunB ainsi que par la phosphorylation de Erk1/2 (Lin et al., *J Biol Chem.*, 2007, 14:27277-84.). Pour ce faire,  $5.10^5$  cellules sontensemencées en boîte 35 mm de diamètre dans 2 ml de milieu complet (DMEM, 10 % SVF, 2 mM glutamine). 24 h après, les

65

cellules sont mises en carence 24 h dans 1.8 ml de milieu dépourvu de sérum. Les cellules sont ensuite stimulées pendant 3 h par 200 µl de FGF19 concentré 10 fois en absence ou en présence d'anticorps anti-FGFR4 contrôle ou 40-12. Le milieu est ensuite retiré, les cellules lavées une fois par du PBS froid et lysées sur boîte pendant

5 30 min à 4°C par 75 µl de tampon RIPA supplémenté en inhibiteur de protéase. L'extrait protéique total est ensuite centrifugé 10 min à 4 °C à 13000 rpm et le surnageant analysé par la technique de Western blot. Les membranes sont ensuite incubées 2 h à température ambiante dans du TBS, tween 0.05 %, 5 % lait puis l'anticorps primaire anti-cFos (Cell Signaling Technology, réf 2250), anti-JunB (Cell

10 Signaling Technology, réf 3746) et anti-phosphoErk1/2 (Cell Signaling Technology, réf 4377) sont ajoutés au 1/1000<sup>ème</sup> et incubés une nuit à 4°C sous agitation lente. La membrane est rincée trois fois par du TBS, tween 0.05 % et l'anticorps secondaire couplé à la HRP est incubé 4 h à 4°C dilué au 1/2000<sup>ème</sup> dans du TBS, tween 0.05 %, 5 % lait. Les résultats de Western-blot sont alors quantifiés à l'aide d'un Chemigenius

15 (Syngene). L'intensité des bandes obtenues avec les différents anticorps sont pondérées par l'intensité des bandes obtenues avec l'anticorps anti-actine directement couplé à la HRP et utilisé au 1/3000<sup>ème</sup> (Santa Cruz Biotechnology, réf Sc-8432-HRP).

Le FGF19 à 30 ng/ml induit la synthèse des protéines JunB et cFos ainsi que la

20 phosphorylation de Erk1/2 dans les cellules Hep3b. Cette néo-synthèse de protéine et la phosphorylation de Erk sont inhibées complètement par l'anticorps anti-FGFR4 40-12 à 100 µg/ml alors que l'anticorps contrôle n'a aucun effet inhibiteur. Ces effets observés sur les membranes de Western-blot (Fig. 9A) sont quantifiés et les intensités des bandes de chaque membrane sont représentées sous forme de graphe

25 (Fig. 9B).

Deuxièmement, des expériences de prolifération cellulaire proprement dites ont été menées. 5000 cellules sontensemencées en plaque 96 puits dans 100 µl de milieu DMEM, 10 % SVF, 2 mM glutamine. 24 h après, les cellules sont déprivées dans un milieu de culture sans sérum pendant 24 h. Les cellules Hep3b sont ensuite stimulées

30 72 h par 100 µl de milieu sans sérum supplémenté par 10 ng/ml de FGF19 (production interne à Sanofi-Aventis R&D) ou par 10 % sérum en absence ou en présence d'anticorps témoins ou d'anticorps monoclonal anti-FGFR4 antagoniste 40-12. Après 3 jours, la prolifération cellulaire est quantifiée à l'aide du kit CellTiter Glo (Promega, France).

56

De ces expériences, il en ressort que le sérum ainsi que le FGF19 sont capables de stimuler la prolifération des Hep3b. L'anticorps anti-FGFR4 antagoniste 40-12 inhibe partiellement à 100 µg/ml cette prolifération induite au sérum alors que l'anticorps témoin ne présente pas d'activité inhibitrice (Fig. 10A). De plus, l'anticorps 40-12 à 10 µg/ml bloque complètement la prolifération induite par le FGF19 (Fig. 10B). L'anticorps témoin n'a pas d'effet.

Ceci démontre que l'anti-FGFR4 antagoniste objet de l'invention peut être utilisé comme agent thérapeutique anti-tumoral dans la cadre de tumeurs dépendantes du FGF19 ou du FGF-R4 et que cet anticorps serait particulièrement efficace dans le traitement des hépatocarcinomes.

Afin de simplifier l'étude de l'effet des anticorps anti-FGFR4 sur les cellules Hep3b, un test ELISA a été mis au point pour la détection de la phosphorylation de Erk1/2 suite à la stimulation de ces cellules par du FGF-19 (en corrélation avec les expériences décrites dans l'exemple 8), du FGF-2 ou du sérum de veau fœtal.

Pour ce faire, 50 000 cellules Hep3b sontensemencées en plaque 96 puits noires fond transparent (COSTAR, ref 3603) dans 100µl de milieu DMEM, 10% SVF, 2mM glutamine. Après 24h, les cellules sont mises en carence pendant 24h dans du milieu DMEM, 2mM glutamine sans SVF. Le milieu est ensuite aspiré et remplacé par 100µl de milieu de carence pré-équilibré à 37°C contenant le FGF ou le SVF, ainsi que les anticorps évalués aux différentes doses. Les cellules sont incubées 3h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu de stimulation est alors aspiré, les puits sont rincés par du PBS à 4°C et les cellules sont fixées par ajout de 200µl de PFA (paraformaldéhyde) 4% dans du PBS pendant 15min à température ambiante. Le PFA est retiré et les cellules lavées trois fois par 200µl de PBS. Le marquage par des anticorps pour la détection de phospho-Erk1/2 directement sur les cellules Hep3b commence par la saturation des sites non spécifiques avec 100µl de tampon de saturation (21.25ml de PBS, 1.25ml de sérum non immun de chèvre à 10% (Zymed, ref 50-062Z), 75µl de triton X100) pendant 2h. Le tampon de saturation est remplacé par 50µl d'anticorps primaire anti-phospho Erk1/2 (Cell Signaling Technology, ref 4377) dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du tampon PBS, 1% BSA, 0.3% triton X100. L'anticorps primaire est incubé avec les cellules une nuit à 4°C. Il est ensuite rincé par 3 lavages de 200µl de PBS et révélé à l'aide d'un anticorps secondaire anti-rabbit couplé à l'AlexaFluor 488 (Molecular Probes, ref A11008) dilué au 1/5000<sup>ème</sup> dans du tampon PBS, 1% BSA, 0.3% triton

X100 pendant 4h. L'anticorps secondaire est ensuite rincé par 3 lavages de 200µl de PBS et 100µl de PBS est alors ajouté à chaque puits. La fluorescence est lue par-dessus à l'aide d'un lecteur de plaque de type EnVision 2103 Multilabel Reader (Perkin Elmer) en utilisant le filtre FITC.

- 5 Cette technique permet de confirmer que le FGF-19 à 30ng/ml induit la phosphorylation de Erk1/2 dans les cellules Hep3b et que le 40-12 est capable de bloquer cette stimulation dès la dose de 3 µg/ml (Fig. 9C). Le FGF-2 ainsi que le sérum sont également capable d'induire le système. Dans ces 2 derniers, l'anticorps 40-12 inhibe l'effet du FGF-2 et du sérum à des doses plus élevées (30-100µg/ml ;
- 10 Fig. 9C).

La détection de phospho-Erk1/2 par ELISA à aussi permis de montrer que des anticorps anti-FGFR4 actifs dans le modèle de l'angiogenèse *in vitro* sont également capables de bloquer entre 70 et 95% de la phosphorylation de Erk1/2 induite par le FGF-19 à la dose de 3µg/ml (Fig. 9D).

15

De manière avantageuse, les anticorps de la présente invention ont un effet antagoniste à la fois sur l'angiogenèse pathologique associée au développement de la tumeur et sur la croissance tumorale hépatique proprement dit, en particulier sur un modèle d'hépatocarcinome.

20

#### **Exemple 8 : Effet antagoniste de l'anticorps 40-12 dans le modèle murin de cancer pancréatique**

- Pour ce modèle pharmacologique, des souris femelles Rip1-Tag2 (Charles River Laboratory, France) de fond génétique C57Bl/6J sont utilisées. Les animaux ont à partir de la semaine 9 après naissance de l'eau de boisson supplémentée par 5% de saccharose. Les souris sont traitées de la semaine 10 à la semaine 12.5 dans un protocole de traitement en intervention, une fois par semaine par une injection par voie sous-cutanée des anticorps anti-FGFR4 40-12 ou contrôle à la dose de 25 mg/kg
- 25 (Fig. 14A). Ce protocole est approuvé par le « Comité expérimentation Animale (Animal Care and Use Committee) » de Sanofi-Aventis Recherche. Nos installations zootechniques, l'attention prêtée aux animaux ainsi que les protocoles de traitement sont en accord avec les principes imposés par la convention européenne sur la
- 30

C 8

protection des animaux Vertébrés et euthanasiés après la période de traitement ou lorsque la charge tumorale et/ou les effets secondaires oblige leur retrait de l'étude.

Pour la mesure de la charge tumorale, les animaux sont euthanasiés à la fin de l'expérience et les tumeurs sont micro-disséquées à partir de pancréas fraîchement excisés. Le volume tumoral en  $\text{mm}^3$  est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse en appliquant la formule  $[\text{volume} = 0.52 \times (\text{largeur})^2 \times (\text{longueur})]$  afin de se rapprocher du volume d'un sphéroïde. La charge tumorale par souris est calculée par le cumul du volume des tumeurs de chaque souris.

Pour l'analyse histochimique de la densité vasculaire, les animaux sont anesthésiés, les pancréas collectés, fixés une nuit dans de l'accustain® (Sigma) puis enchâssés dans de la paraffine. Des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont préparées pour chaque échantillon. Les cellules endothéliales sont détectées par l'incubation des coupes avec de la trypsine (Zymed, ref 00-3003) à 37°C pendant 10 min, puis avec un anticorps anti-CD31 de souris fait chez le rat et dilué au 1/50<sup>ème</sup> (BD Pharmingen).

Pour révéler les régions marquées par l'anticorps, les coupes sont incubées avec un anticorps anti-rat couplé à la biotine pendant 30 min, puis avec de la streptavidine couplé à la HRP pendant également 30 min (Vectastain® ABC kit, Vector), et enfin avec du DAB pendant 5 min (Vector, ref SK4100). Les coupes sont alors marquées avec de l'hématoxylin diluée au 1/10<sup>ème</sup> (Dako, S-3309). Les prises de vue sont réalisées à l'aide d'une caméra montée sur un microscope (Nikon, E-800) à un grossissement total de 200 fois. Les images sont analysées par un logiciel (Visiolab, Biocom). Les vaisseaux sanguins dans la tumeur sont comptés et classés en fonction de leur surface : les petits vaisseaux entre 5 et 20  $\mu\text{m}^2$ , les moyens entre 21 et 100  $\mu\text{m}^2$  et les gros à partir de 101  $\mu\text{m}^2$ . Deux porte-objets par pancréas sont analysés afin de déterminer la densité vasculaire correspondant au nombre total d'éléments marqués par champ.

Dans ce modèle, le traitement sous-cutané à l'aide de l'anticorps anti-FGFR4 40-12 à 25 mg/kg une fois par semaine entre les dixième et douzième semaines, permet de réduire la charge tumorale de 55% et de façon significative (Fig11B) et à tendance à réduire de 34% le nombre de tumeurs par pancréas (Fig. 11C) alors que le traitement contrôle n'a aucun effet. Cette inhibition du développement tumoral grâce à l'anticorps anti-FGFR4 40-12 est accompagnée par une réduction significative de 31% de la densité vasculaire totale (Fig. 11D) correspondant à une réduction observée du

nombre de vaisseaux sanguins dans l'ensemble des groupes de taille de vaisseaux marqués à l'aide d'un anticorps anti-CD31 (Fig. 11D).

Ces résultats *in vivo* montrent clairement qu'un anticorps anti-FGFR4 antagoniste est capable d'inhiber le recrutement et la formation des vaisseaux sanguins dans la  
5 tumeur. Cette inhibition de la vascularisation tumorale s'accompagne d'une réduction du nombre de tumeurs par pancréas et du volume tumoral total.

De manière avantageuse, les anticorps de la présente invention ont un effet antagoniste à la fois sur l'angiogenèse pathologique et sur la croissance tumorale  
10 hépatique (sur un modèle d'hépatocarcinome) et pancréatique.

**Exemple 9 : Réactivité croisée de l'anticorps envers les FGF-R4 humain, murin et de rat.**

15 Dans un premier temps, des expériences de compétition de liaison ont été réalisées. Pour ce faire, du FGF2 a été marqué au niveau des 2 cystéines libres à l'aide d'un AlexaFluor® 488 nm C-5 maléimide (Molecular Probes, A10254) selon les recommandations du fournisseur. Ce FGF2-AF488 à 10 ng/ml est capable de se lier sur les FGF-R4 humains exprimés à la surface de cellules 300-19 transfectées (Fig.  
20 8). Cette liaison est spécifique puisque l'ajout en excès de FGF2 non marqué permet de déplacer l'interaction FGF2/FGF-R4 (Fig. 8A). La même expérience a été réalisée en rajoutant des doses croissantes de l'anticorps 40-12 ou de l'anticorps témoins 64-12. Seul l'anticorps antagoniste 40-12 est apte à déplacer la liaison FGF2-AF488/FGF-R4, et ce, avec une IC<sub>50</sub> de 3500 ng/ml soit 23 nM montrant que l'effet  
25 antagoniste de cet anticorps serait dû à sa capacité de déplacer la liaison FGF/FGF-R4.

Dans un second temps et dans le but de déterminer l'aptitude du clone 40-12 à bloquer la liaison FGF/FGF-R4 chez d'autres espèces que l'Homme, une expérience de dissociation a été réalisée en utilisant les couples FGF2/FGF-R4 de souris, de rat  
30 et humain en référence. Pour ce faire, du FGF2 murin (R&D, réf 3139-FB-025) ou de rat (R&D, réf 3339-FB-025) a été marqué de la même façon que le FGF2 humain par un AlexaFluor 488. Les expériences de dissociation ont été réalisées en utilisant les lignées 300-19 transfectées avec les récepteurs FGF-R4 de souris ou de rat. Les résultats montrent que l'anticorps anti-FGFR4 antagoniste 40-12 est capable de

dissocier la liaison FGF2/FGF-R4 dans un système souris ou rat avec la même efficacité que dans le système humain. En effet, les IC<sub>50</sub> sont de 3500, 4110 et 3940 ng/ml soit 23, 27 et 26 nM pour les complexes FGF2/FGF-R4 humain, murin ou de rat respectivement (Fig. 13A, 13B et 13C respectivement). Cette capacité à se lier au FGF-R4 de rongeurs a été vérifié par ELISA. L'anticorps 40-12 se lie aussi bien au FGF-R4 humain et murin (Fig. 12).

Ces résultats indiquent que l'anticorps anti-FGFR4 40-12 pourra être utilisé dans des modèles pharmacologiques sur rongeurs (au moins souris et rat) et que les résultats obtenus devraient être prédictifs de l'efficacité chez l'Homme.

De même, des études menées sur les anticorps issus des clones 8, 31, 33 et 36 montrent que ces anticorps reconnaissent à la fois le FGF-R4 humain et le FGF-R4 murin (Tableau 4 ci-dessous)

**Tableau 4 :** Paramètres cinétiques de liaison des anticorps anti-FGFR4 8, 31, 33 et 36 mesurés par Surface Plasmon Resonance (BIAcore 3000) :

|          | sur h-FGFR4-Histag                     |                         |          | sur m-FGFR4-Histag                     |                         |          |
|----------|----------------------------------------|-------------------------|----------|----------------------------------------|-------------------------|----------|
|          | Kon (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Koff (s <sup>-1</sup> ) | KD (M)   | Kon (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Koff (s <sup>-1</sup> ) | KD (M)   |
| Clone 8  | 8,93E+05                               | 2,92E-04                | 3,27E-10 | 1,20E+06                               | 1,36E-04                | 1,15E-10 |
| Clone 31 | 6,48E+05                               | 9,80E-04                | 1,52E-09 | 9,14E+05                               | 1,80E-03                | 1,97E-09 |
| Clone 33 | 8,05E+05                               | 6,17E-04                | 7,71E-10 | 1,01E+06                               | 7,04E-04                | 6,92E-10 |
| Clone 36 | 2,44E+05                               | 6,31E-04                | 2,62E-09 | 3,30E+05                               | 7,52E-04                | 2,28E-09 |

**Exemple 10 : Détermination de l'épitope reconnu par les anticorps anti-FGF-R4**

**A- Détermination de l'épitope reconnu par l'anticorps anti-FGFR4 40-12**

Un criblage a été réalisé pour déterminer le domaine spécifique du FGFR4 reconnu par l'anticorps 40-12 par dosage ELISA. Grâce à l'utilisation d'une forme délétée du domaine D1 de FGF-R4 en ELISA, il a été établi que l'anticorps 40-12 interagissait au niveau des domaines D2-D3 de FGF-R4 (Fig. 12).

71

Un second criblage a été réalisé par dosage ELISA, en utilisant comme antigène de capture les construits contenant soit le domaine D1 (SABVA4794) ou le domaine D2 (SABVA4796) ou le domaine D3 (SABVA4799) de protéine hFGFR4 comme décrits dans l'exemple 2. L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). L'hybridome 40-12 a ensuite été ajouté puis détecté grâce à l'anticorps de lapin anti-souris IgG conjugué à la peroxydase (Sigma ; réf. A9044-dilution au 1:50000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H2O2 (Interchim ; réf UP664780) et les mesures de densité optique (O.D.) effectuées à 450 nm. Le tableau 5 résume les résultats obtenus:

**Tableau 5 :** Mesure de la liaison de l'anticorps 40-12 aux différents sous-domaines de FGF-R4

| Domaine étudié        | D1<br>SABVA4794 | D2<br>SABVA4796 | D3<br>SABVA4799 | D1-D3<br>FGFR4 -Fc |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Signal (O.D., 450 nm) | 0.185           | 3.000           | 0.105           | 3.000              |

L'anticorps anti-FGFR4 reconnaît donc le domaine D2 de la partie extracellulaire de la protéine FGFR4.  
D'autre part, la protéine FGFR4-Fc dénaturée avec du SDS n'est pas reconnue par l'anticorps 40-12 en analyse par Western Blot, ce qui indique que l'épitope ciblé par le 40-12 sur le domaine D2 de FGFR4 est de type conformationnel.

B- Détermination de l'épitope reconnu par les anticorps anti-FGFR4 8, 31, 33, 36.

Un criblage a été réalisé pour déterminer le domaine spécifique du FGFR4 reconnu par les anticorps 8, 31, 33, 36 par dosage ELISA en utilisant comme antigène de capture les construits contenant soit les domaines D2 et D3 (SEQ ID NO 42) soit la protéine hFGFR4-Histag (SABVA4614, SEQ ID NO 40). L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Des surnageants de cultures de HEK293 transfectées transitoirement par des plasmides permettant la sécrétion des anticorps 8, 31, 33, 36 ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de lapin anti-humain IgG conjugué à la peroxydase (DakoCytomation, réf. P0214-dilution au 1:5000). La révélation a été réalisée avec le

substrat TMB-H2O2 (Interchim ; réf UP664780) et les mesures de densité optique (O.D.) effectuées à 450 nm. Le tableau 6 ci-dessous résume les résultats obtenus:

Tableau 6 : Liaison des anticorps issus des clones 8, 31, 33 et 36 au FGF-R4 entier ou au sous-domaine D2-D3 (signal OD à 450nm)

|          | hFGFR4-Histag | hFGFR4(D2,D3)-Histag |
|----------|---------------|----------------------|
| Clone 8  | 3,898         | 3,860                |
| Clone 31 | 3,859         | 3,741                |
| Clone 33 | 3,752         | 3,621                |
| Clone 36 | 3,751         | 3,616                |

Les anticorps 8, 31, 33 et 36 reconnaissent donc le domaine D2-D3 de la partie extracellulaire de la protéine FGFR4.

Tableau 7 : séquences utilisées, obtenues et déduites

|                 | Séquences nucléotidiques | Séquences protéiques   |
|-----------------|--------------------------|------------------------|
| Anticorps 40-12 |                          |                        |
| VH + CH         | SEQ ID NO 1              | SEQ ID NO 2            |
| VL + CL         | SEQ ID NO 3              | SEQ ID NO 4            |
| VH              | SEQ ID NO 5              | SEQ ID NO 6            |
| VL              | SEQ ID NO 7              | SEQ ID NO 8            |
| CDR VH          |                          | SEQ ID NO 9 ; 10 ; 11  |
| CDR VL          |                          | SEQ ID NO 12 ; 13 ; 14 |
| Anticorps 64-12 |                          |                        |
| VH + CH         | SEQ ID NO 15             | SEQ ID NO 16           |
| VL + CL         | SEQ ID NO 17             | SEQ ID NO 18           |

|                                                                 |                                                                 |                        |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------|
| VH                                                              | SEQ ID NO 19                                                    | SEQ ID NO 20           |
| VL                                                              | SEQ ID NO 21                                                    | SEQ ID NO 22           |
| CDR VH                                                          |                                                                 | SEQ ID NO 23 ; 24 ; 25 |
| CDR VL                                                          |                                                                 | SEQ ID NO 26 ; 27 ; 28 |
| <b>Séquences humanisées</b>                                     |                                                                 |                        |
| Chaîne légère 1                                                 | SEQ ID NO 29                                                    | SEQ ID NO 30           |
| Chaîne légère 2                                                 | SEQ ID NO 31                                                    | SEQ ID NO 32           |
| Chaîne lourde 1                                                 | SEQ ID NO 33                                                    | SEQ ID NO 34           |
| Chaîne lourde 2                                                 | SEQ ID NO 35                                                    | SEQ ID NO 36           |
| Chaîne lourde 3                                                 | SEQ ID NO 37                                                    | SEQ ID NO 38           |
| <b>Constructions</b>                                            |                                                                 |                        |
| hFGFR4-Histag                                                   | SEQ ID NO 39                                                    | SEQ ID NO 40           |
| hFGFR4-Streptag                                                 | SEQ ID NO 68                                                    | SEQ ID NO 69           |
| hFGFR4(D2D3)-Histag                                             | SEQ ID NO 41                                                    | SEQ ID NO 42           |
| mFGFR4-Histag                                                   | SEQ ID NO 43                                                    | SEQ ID NO 44           |
| hFGFR1-Fc                                                       | SEQ ID NO 45                                                    | SEQ ID NO 46           |
| hFGFR2-Fc                                                       | SEQ ID NO 47                                                    | SEQ ID NO 48           |
| rFGFR4                                                          | SEQ ID NO 49                                                    | SEQ ID NO 50           |
| Séquences amorces pour établissement lignée clonale (exemple 4) | SEQ ID NO 51 ; 52 ; 53 ; 54 ; 55 ; 56 ; 58<br>SEQ ID NO 61 ; 62 |                        |
| Domaine transmembranaire FGFR4                                  |                                                                 | SEQ ID NO 59 ; 60      |
| Oligonucléotides amorces tableau 1                              | SEQ ID NO 63 ; 64 ; 65 ; 66 ; 67                                |                        |
| Epitope dans domaine D2                                         |                                                                 | SEQ ID NO 70           |

74

| Anticorps clone 8                                                                      |               |                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------|
| Chaîne légère entière                                                                  | SEQ ID NO 71  | SEQ ID NO 72              |
| Chaîne légère CDR                                                                      |               | SEQ ID NO 73 ; 74 ; 75    |
| Chaîne lourde entière                                                                  | SEQ ID NO 76  | SEQ ID NO 77              |
| Chaîne lourde CDR                                                                      |               | SEQ ID NO 78 ; 79; 80     |
| Anticorps clone 31                                                                     |               |                           |
| Chaîne légère entière                                                                  | SEQ ID NO 81  | SEQ ID NO 82              |
| Chaîne légère CDR                                                                      |               | SEQ ID NO 83 ; 84 ; 85    |
| Chaîne lourde entière                                                                  | SEQ ID NO 86  | SEQ ID NO 87              |
| Chaîne lourde CDR                                                                      |               | SEQ ID NO 88 ; 89 ; 90    |
| Anticorps clone 33                                                                     |               |                           |
| Chaîne légère entière                                                                  | SEQ ID NO 91  | SEQ ID NO 92              |
| Chaîne légère CDR                                                                      |               | SEQ ID NO 93 ; 94 ; 95    |
| Chaîne lourde entière                                                                  | SEQ ID NO 96  | SEQ ID NO 97              |
| Chaîne lourde CDR                                                                      |               | SEQ ID NO 98 ; 99 ; 100   |
| Anticorps clone 36                                                                     |               |                           |
| Chaîne légère entière                                                                  | SEQ ID NO 101 | SEQ ID NO 102             |
| Chaîne légère CDR                                                                      |               | SEQ ID NO 103 ; 104 ; 105 |
| Chaîne lourde entière                                                                  | SEQ ID NO 106 | SEQ ID NO 107             |
| Chaîne lourde CDR                                                                      |               | SEQ ID NO 108 ; 109 ; 110 |
| Sous-domaines de la partie extracellulaire de hFGFR4 fusionnés au domaine Fc de l'IgG1 |               |                           |
| fGFR4_D1::Fc                                                                           | SEQ ID NO 111 | SEQ ID NO 112             |
| fGFR4_D2::Fc                                                                           | SEQ ID NO 113 | SEQ ID NO 114             |
| fGFR4_D3::Fc                                                                           | SEQ ID NO 115 | SEQ ID NO 116             |
| Séquence de région constante d'IgG1 humaine                                            |               | SEQ ID NO 117             |

**Revendications**

1. Antagoniste du récepteur FGF-R4, caractérisé en ce qu'il est un anticorps qui se  
5 lie spécifiquement à FGF-R4
2. Antagoniste selon l'une des revendications 1, caractérisé en ce qu'il se lie au  
domaine D2-D3 du récepteur FGF-R4.
- 10 3. Anticorps selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il se lie au  
domaine D2 du récepteur FGF-R4.
4. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il a  
un  $K_D$  vis à vis du récepteur FGF-R4 déterminé par la technique Surface  
15 Plasmon Resonance (Biacore) inférieur à  $10E-8$  M.
5. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il  
est actif à la fois contre FGF-R4 humain et FGF-R4 murin.
- 20 6. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il  
est un anticorps et comprend au moins un CDR présentant une séquence  
identique à l'une des séquences SEQ ID NO : 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75,  
78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108,  
109 ou 110.  
25
7. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il  
est un anticorps et comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 9, 10, 11, 12,  
13 et 14 ; ou 73, 74, 75, 78, 79 et 80 ; ou 83, 84, 85, 88, 89 et 90 ; ou 93, 94, 95,  
98, 99 et 100 ; ou 103, 104, 105, 108, 109 et 110, où l'un des CDR peut différer  
30 de un à deux acides aminés par rapport à l'une au moins des séquences citées  
ci-dessus, pour autant que l'anticorps garde sa spécificité de liaison.

- 
8. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est un anticorps dont la partie variable de sa chaîne lourde comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 5, 76, 86, 96 ou 106.
- 5
9. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est un anticorps dont la partie variable de sa chaîne légère comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 7, 71, 81, 91 ou 101.
- 10
10. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est un anticorps et en ce que sa séquence comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 2 et 4 ; ou 6 et 8 ; ou 72 et 77 ; ou 82 et 87 ; ou 92 et 97 ; ou 102 et 107.
- 15
11. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il induit une inhibition des voies de signalisation cellulaire contrôlées par FGF-R4..
- 20
12. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il induit une inhibition de l'angiogenèse.
13. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il induit une inhibition de la prolifération cellulaire tumorale.
- 25
14. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que son affinité pour FGF-R4 est 10 fois supérieure à son affinité pour les autres récepteurs à FGF.
- 30
15. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est un anticorps humanisé.
16. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est un anticorps humain.

17. Antagoniste selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne variable légère présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences polypeptidiques SEQ ID NO 30 ou 32.
- 5
18. Antagoniste selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne variable lourde présentant au moins 80% d'identité avec une séquence SEQ ID NO 34, 36 ou 38.
- 10
19. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est un anticorps et en ce qu'il est conjugué à un agent cytotoxique.
20. Utilisation d'un antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes dans le traitement des maladies associées à une angiogenèse pathologique.
- 15
21. Utilisation d'un antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes dans le traitement des hépatocarcinomes ou de tout autre type de cancer hépatique.
- 20
22. Utilisation d'un antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes dans le traitement du cancer du pancréas.
23. Composition pharmaceutique comprenant un antagoniste selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 et des excipients.
- 25
24. Méthode de traitement d'une maladie liée à une angiogenèse pathologique caractérisée en ce qu'elle comprend l'administration au patient d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.
- 30
25. Méthode de traitement d'un cancer caractérisée en ce qu'elle comprend l'administration au patient d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.

- 
26. Lignée cellulaire produisant des anticorps selon la revendication 1 à 19.
27. Procédé de production d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une lignée cellulaire selon la revendication 26.
28. Médicament comprenant un antagoniste selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.
29. Polynucléotide codant pour un polypeptide présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NOS : 2, 4, 6, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 30, 32, 34, 36, 38, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 107, 108, 109 ou 110.
30. Polynucléotide caractérisé en ce qu'il présente une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NOS : 1, 3, 5, 7, 29, 31, 33, 35, ou 37, 71, 76, 81, 86, 91, 96, 101 ou 106.
31. Vecteur recombinant comprenant un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 29 et 30.
32. Cellule hôte comprenant un vecteur selon la revendication 31.

39

1/22

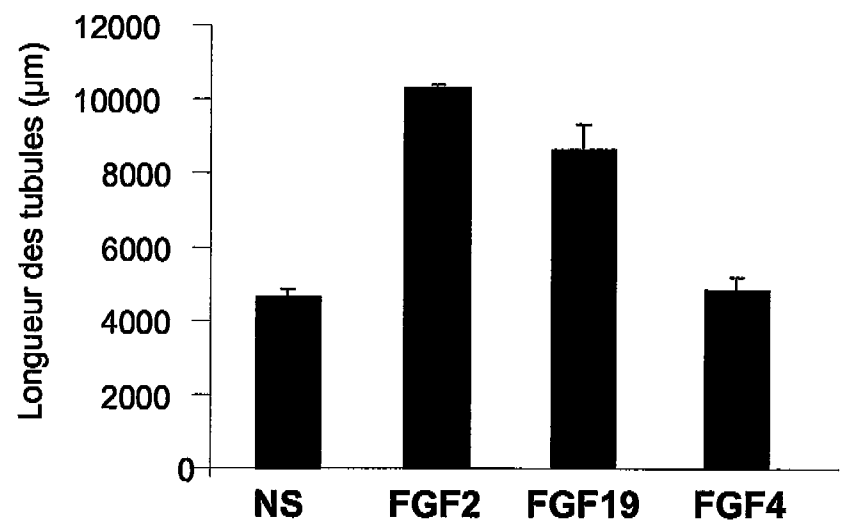


Figure 1A

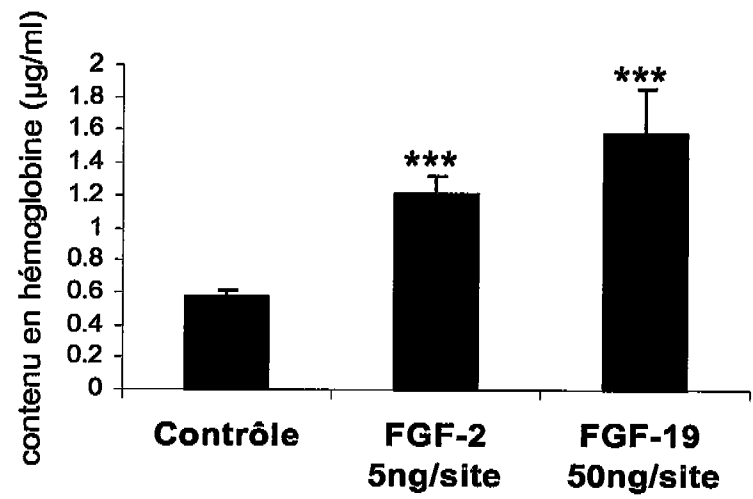


Figure 1B

80

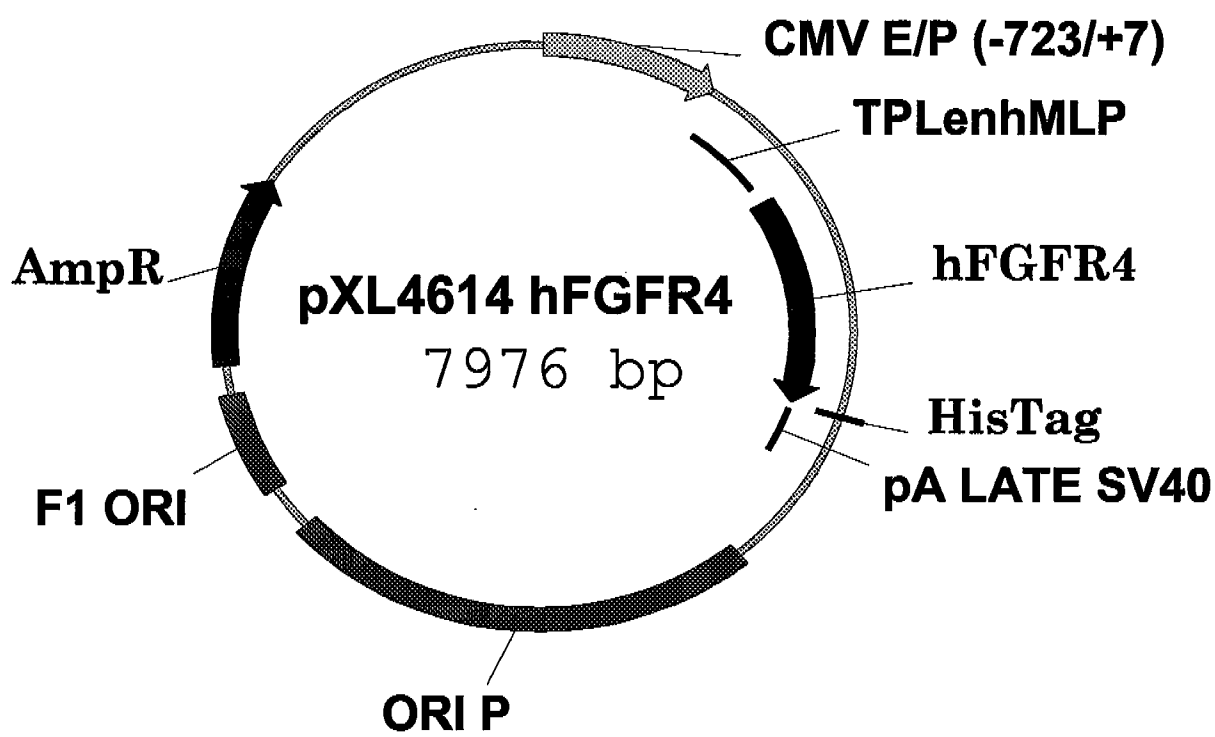


Figure 2A

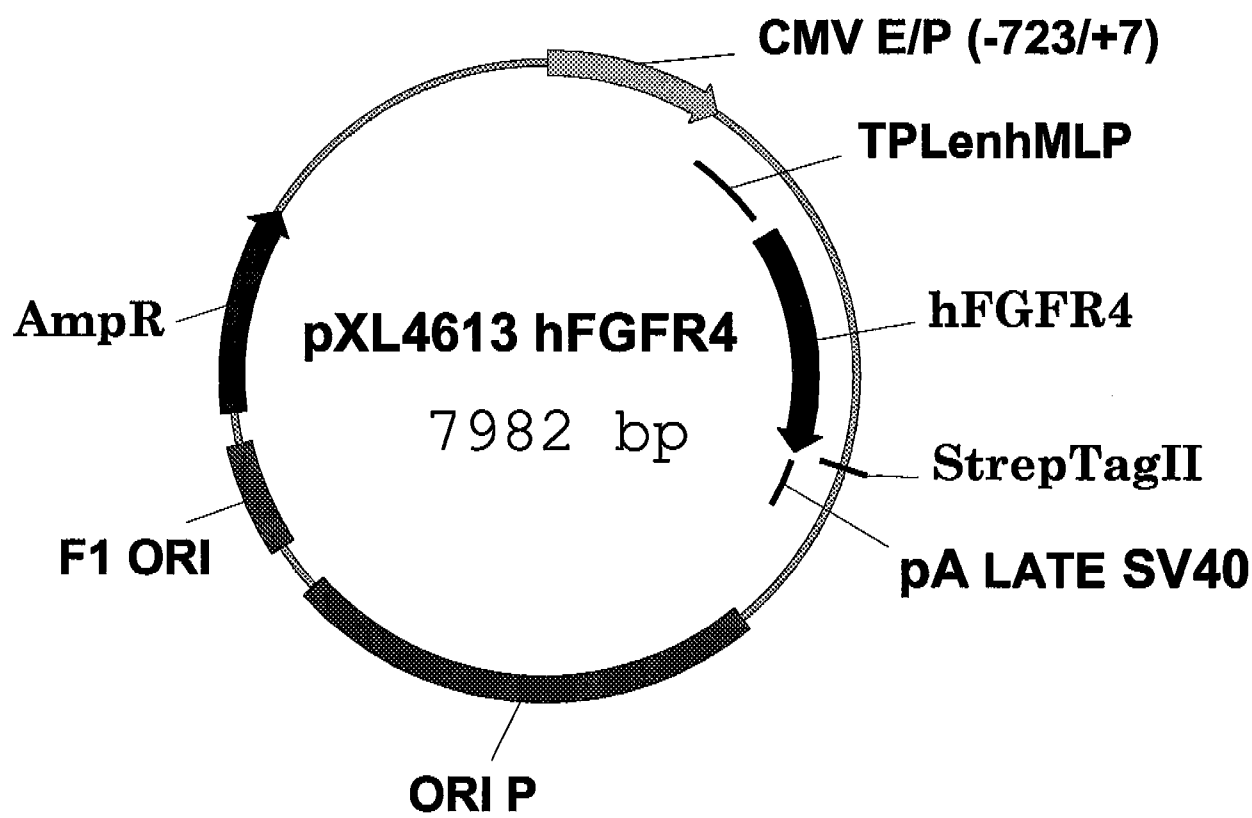


Figure 2B

4/22

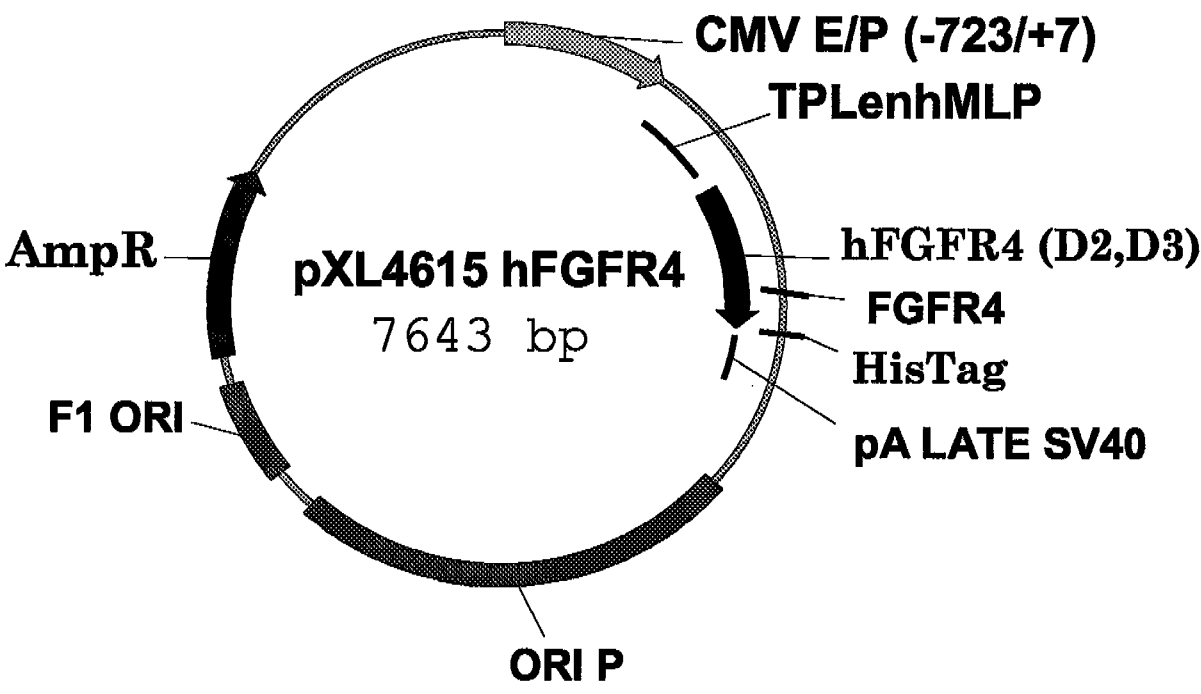


Figure 3

5/22

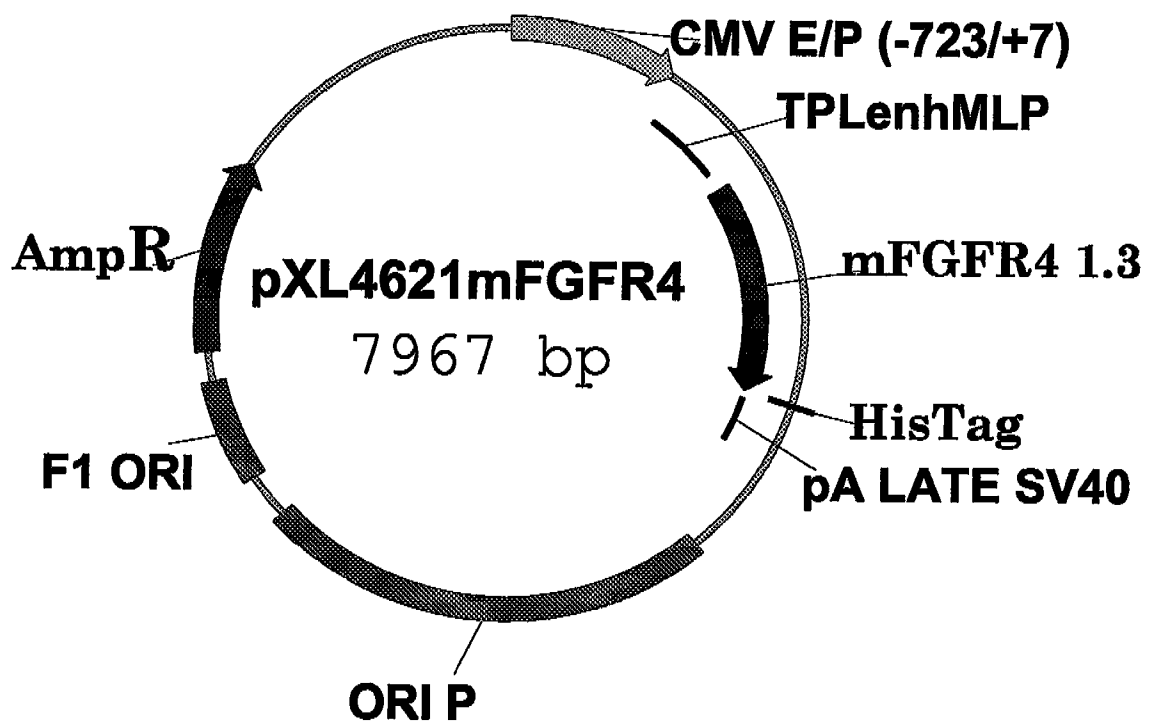


Figure 4

6/22

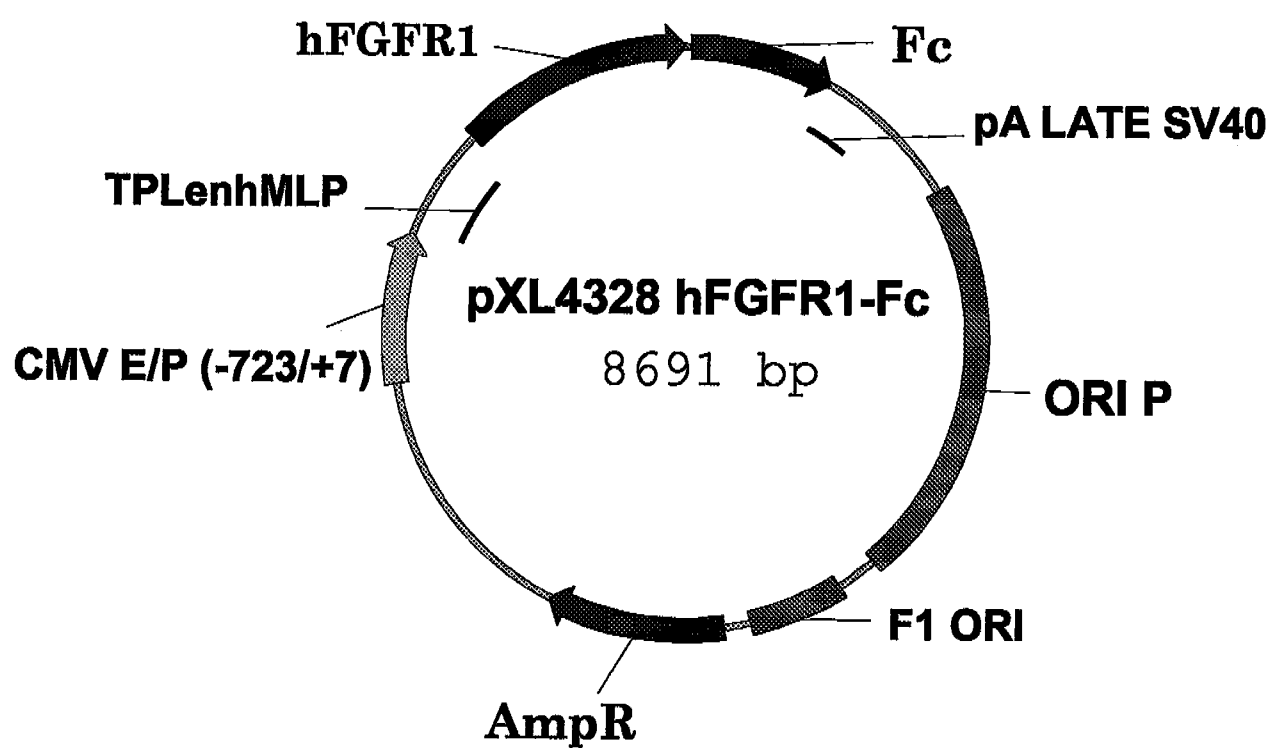


Figure 5

7/22

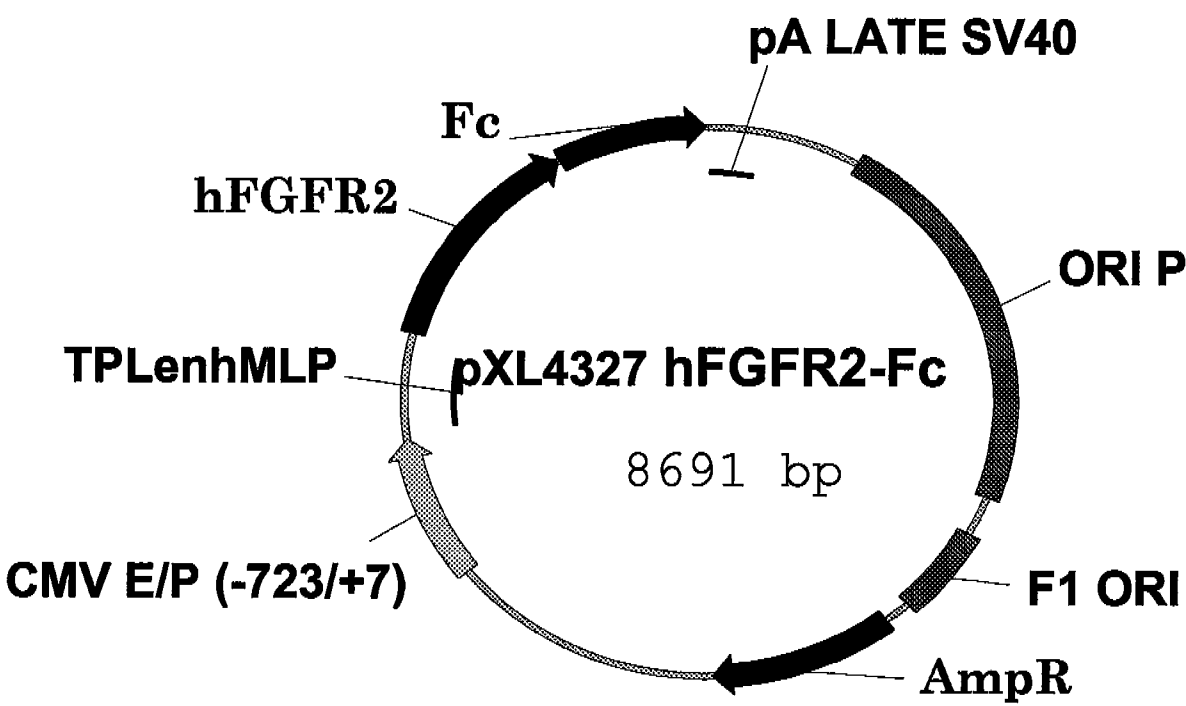


Figure 6

86

8/22

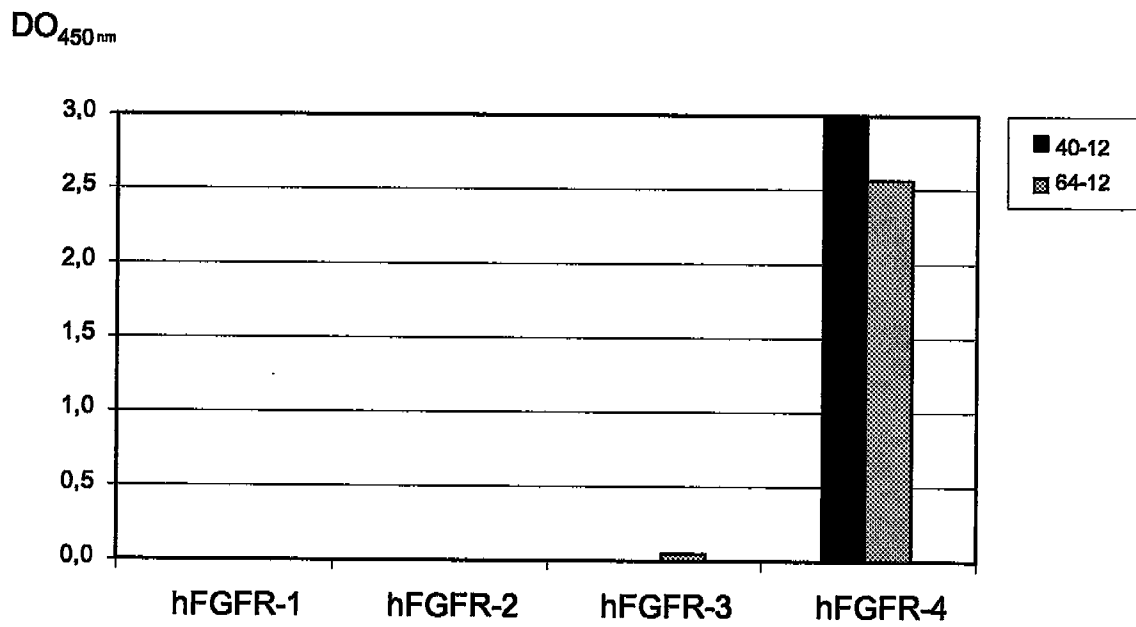


Figure 7

9/22

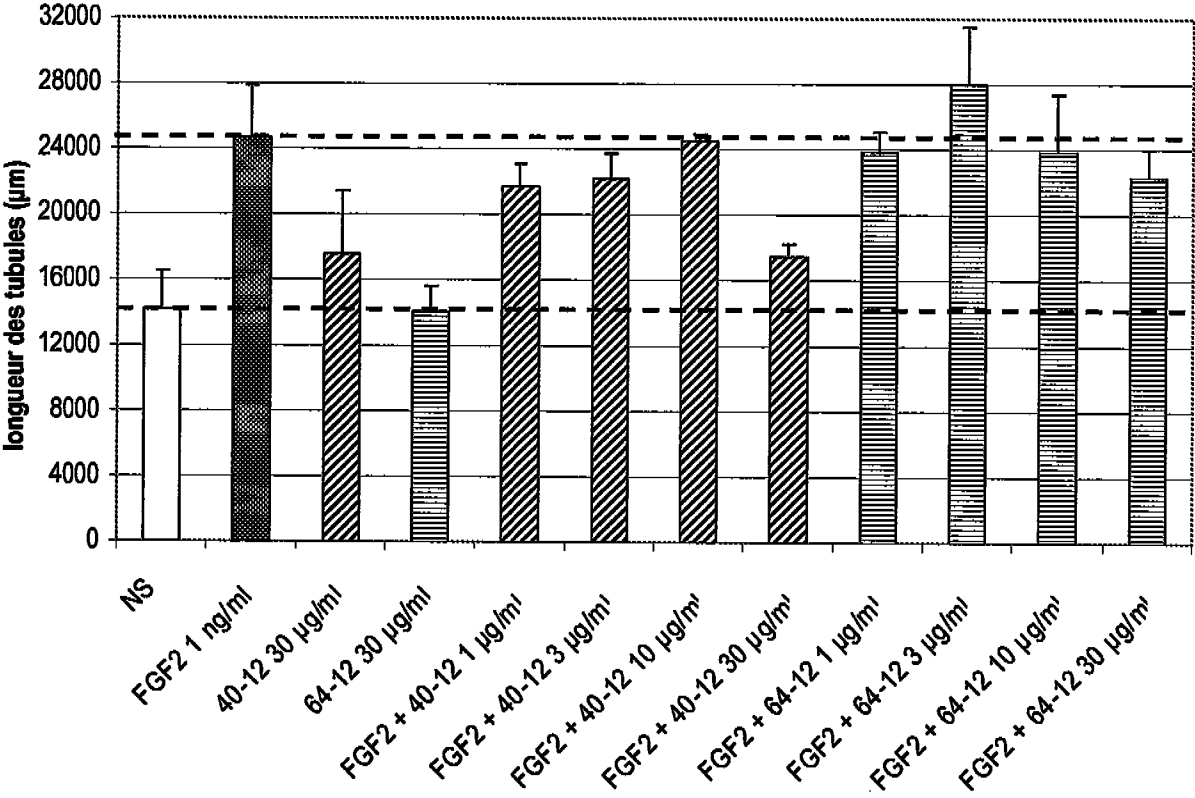


Figure 8A

10/22

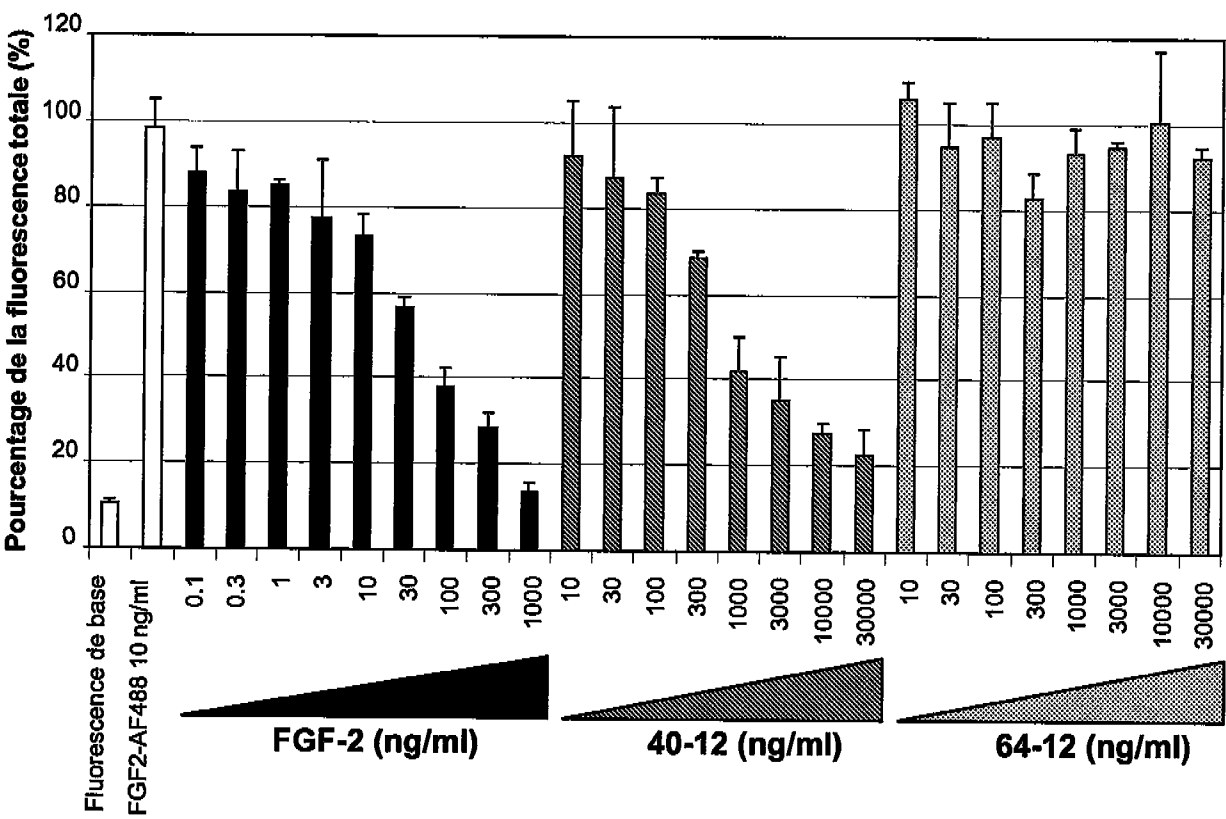


Figure 8B

11/22

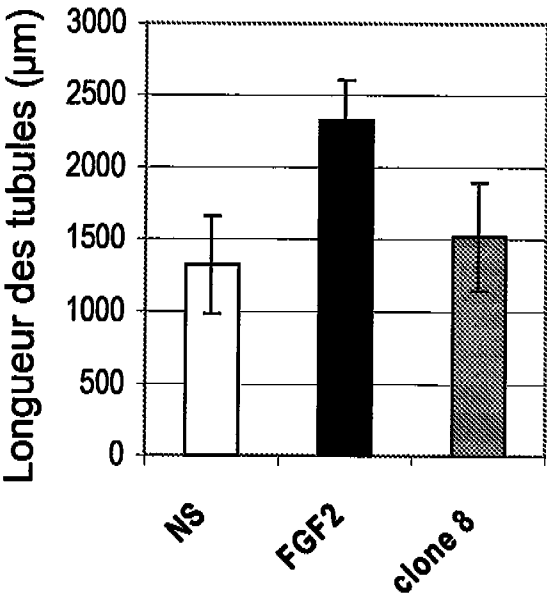


Figure 8C

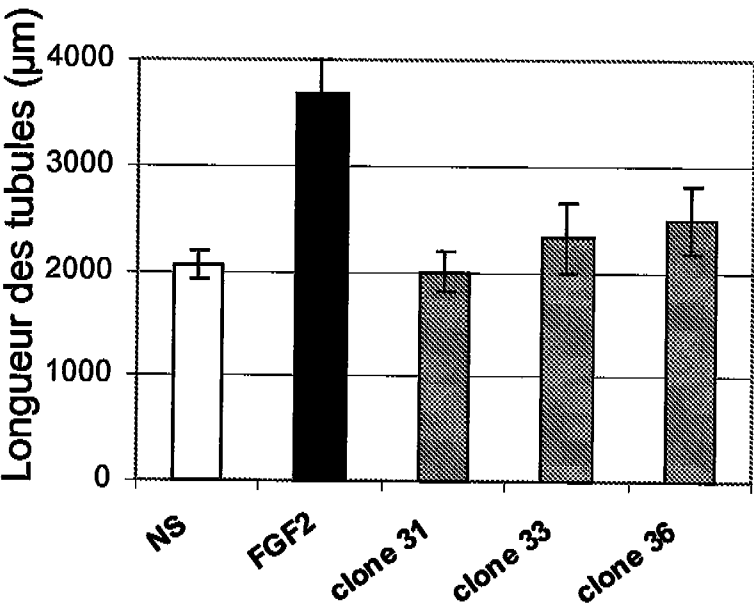


Figure 8D

90

12/22

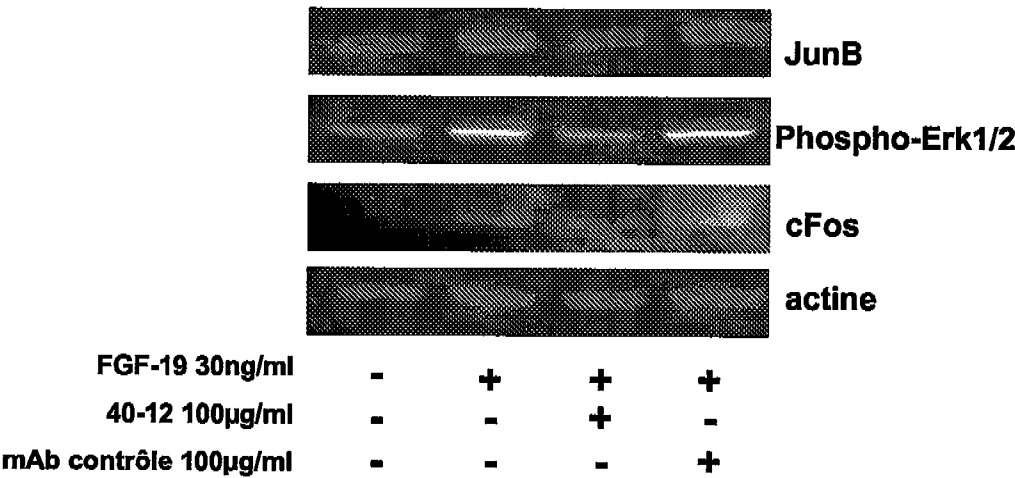


Figure 9A

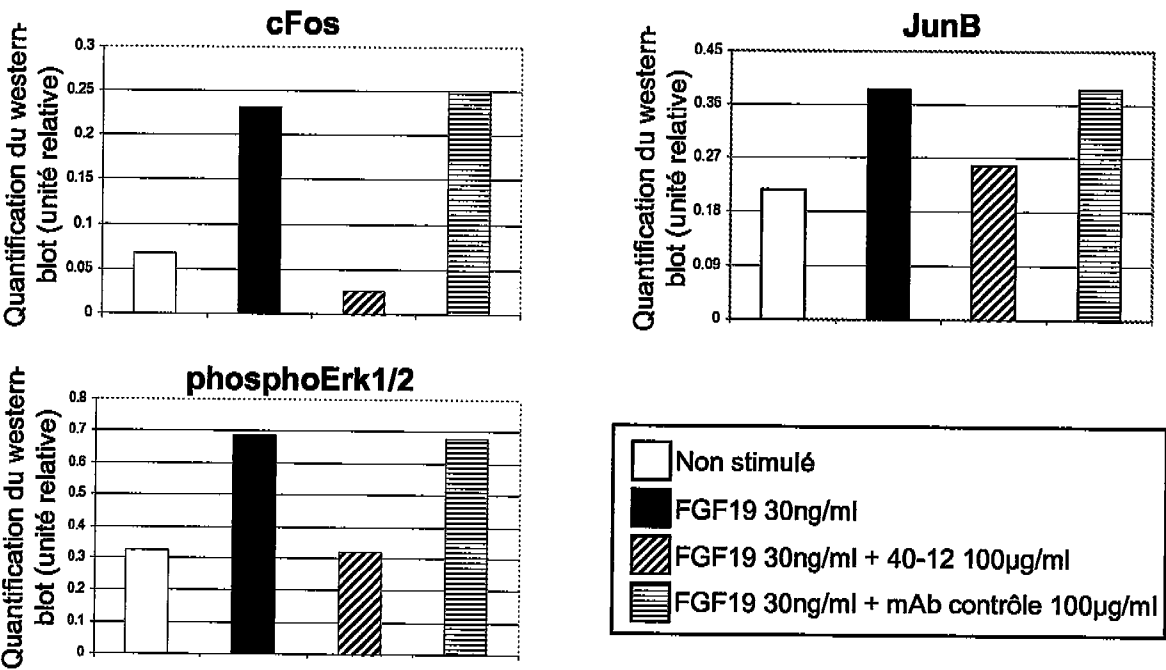


Figure 9B

91

13/22

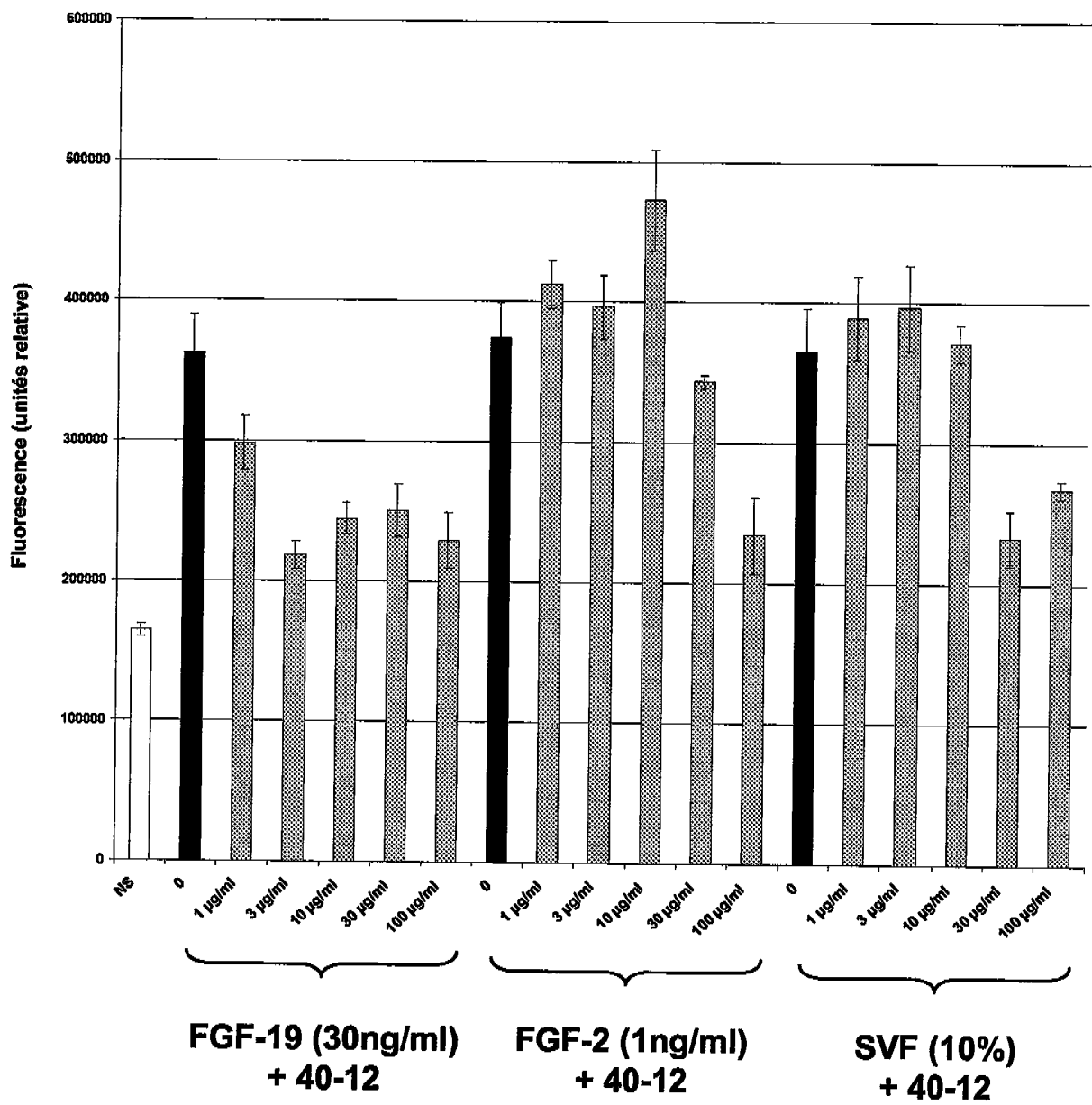


Figure 9C

14/22

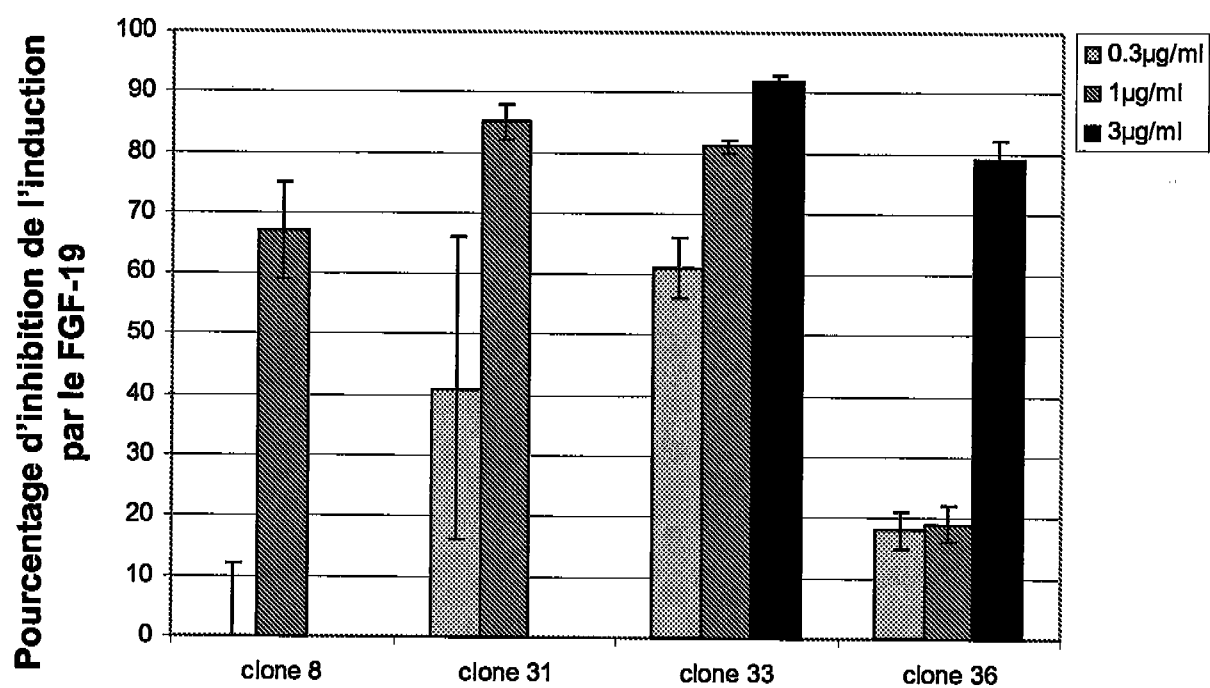


Figure 9D

93

15/22

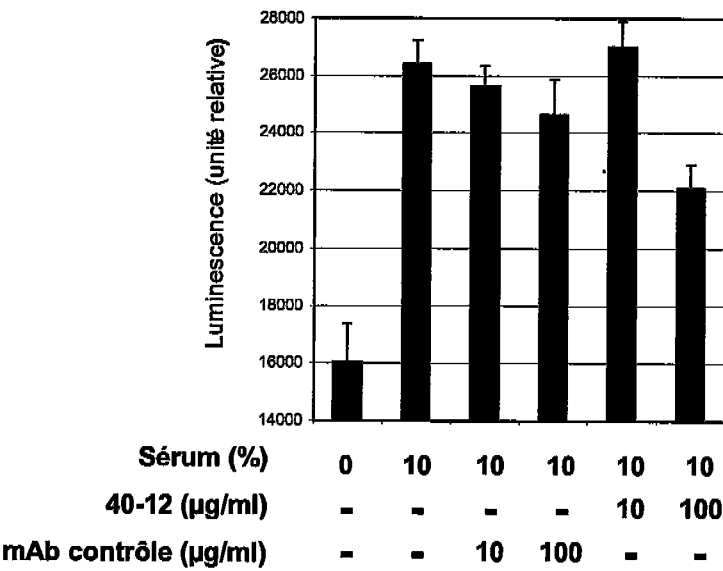


Figure 10A

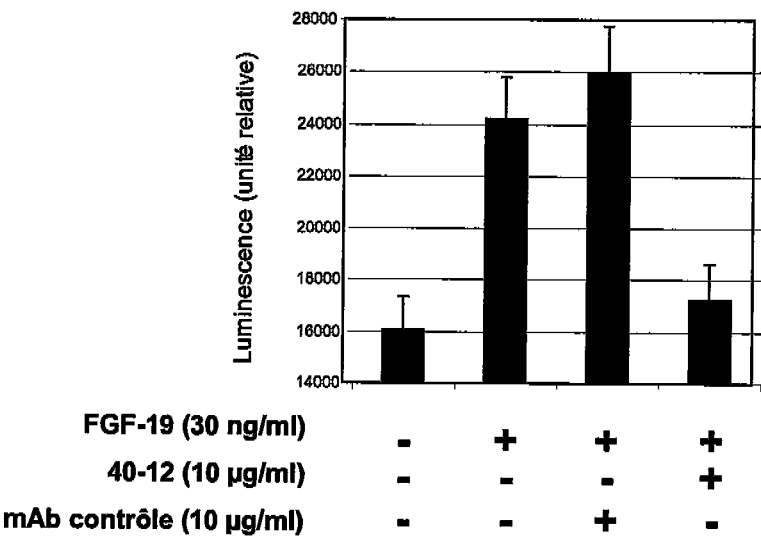


Figure 10B

16/22

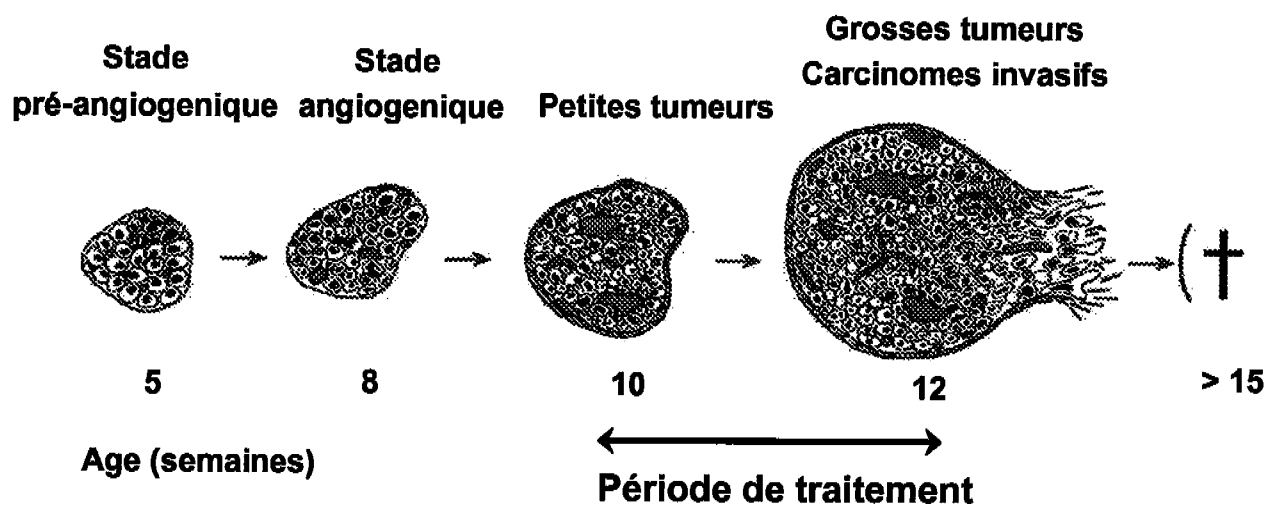


Figure 11 A

95

17/22

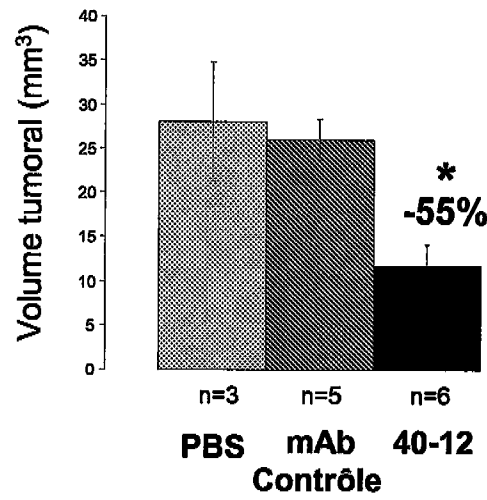


Figure 11B

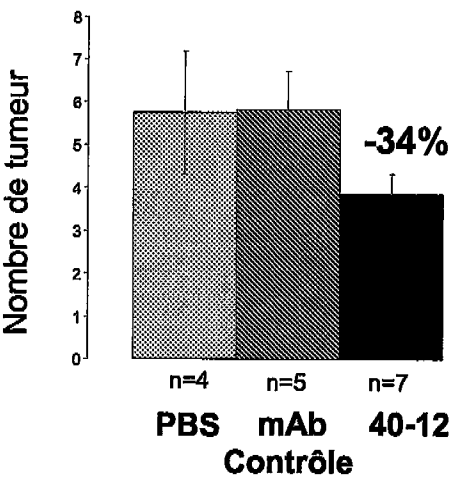


Figure 11C

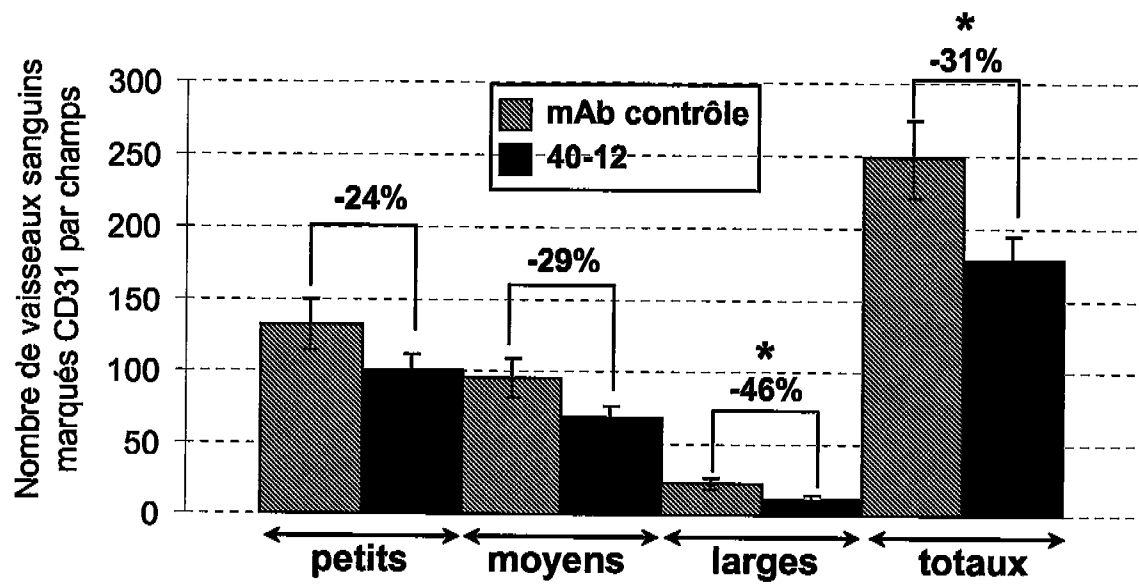


Figure 11D

98

18/22

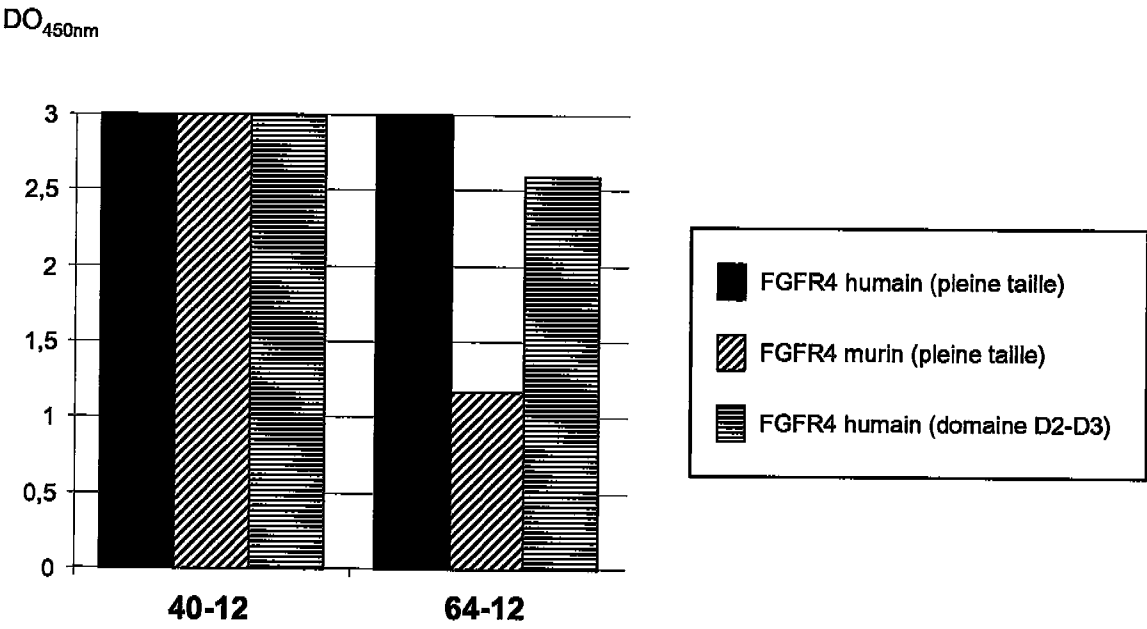


Figure 12

92

19/22

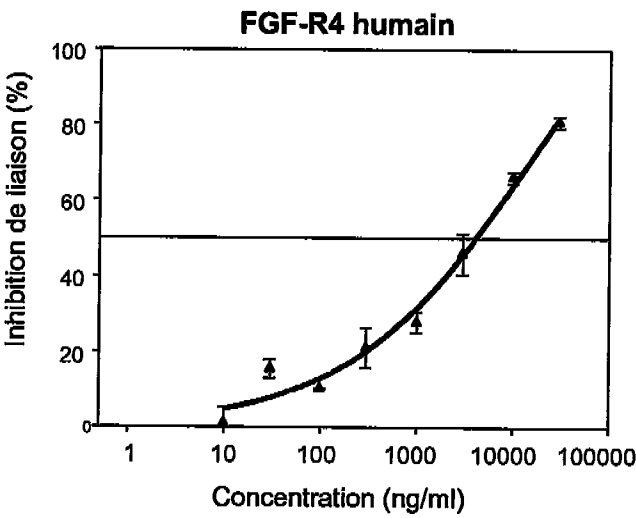


Figure 13A

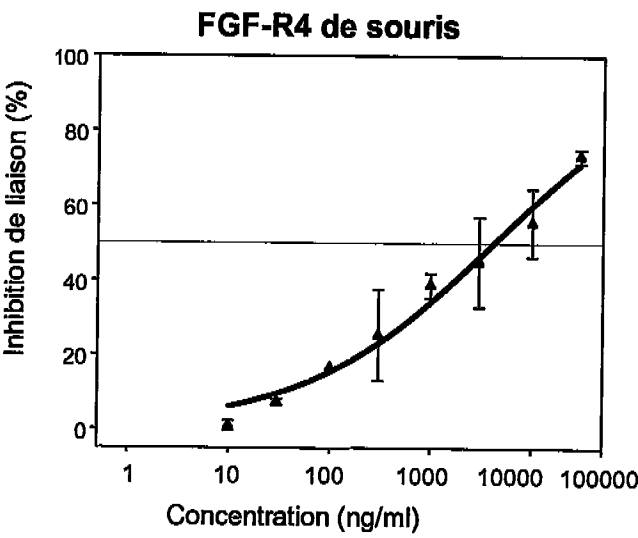


Figure 13B

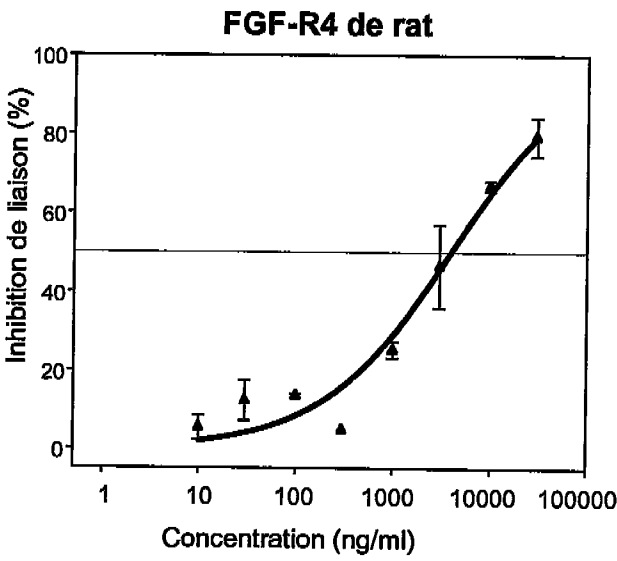


Figure 13C

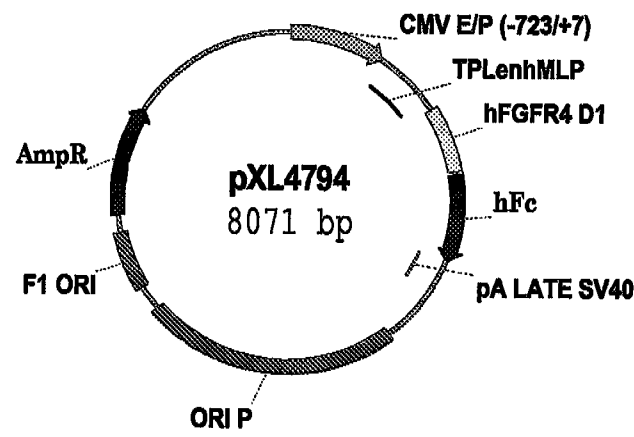


Figure 14A

|     |            |            |            |            |            |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1   | LEASEEVELE | PCLAPSLEQQ | EQELTVALGQ | PVRLCCGRAE | RGGHWYKEGS |
| 51  | RLAPAGRVRG | WRGRLEIASF | LPEDAGRYLC | LARGSMIVLQ | NLTLITGDSL |
| 101 | TSSNDDEDPK | SHRDLSNRHS | YPQQAPYWTH | PQRMEKKLHA | VPAGNTVKFR |
| 151 | CPAAGNPTKT | HTCPPCPAPE | LLGGPSVFLF | PPKPKDTLMI | SRTPEVTCVV |
| 201 | VDVSHEDPEV | KFNWYVDGVE | VHNAKTKPRE | EQYNSTYRVV | SVLTVLHQDW |
| 251 | LNGKEYKCKV | SNKALPAPIE | KTISKAKGQP | REPQVYTLPP | SRDELTKNQV |
| 301 | SLTCLVKGFY | PSDIAVEWES | NGQPENNYKT | TPPVLDSDGS | FFLYSKLTVD |
| 351 | KSRWQQGNVF | SCSVMHEALH | NHYTQKSLSL | SPG        |            |

Figure 14B

99

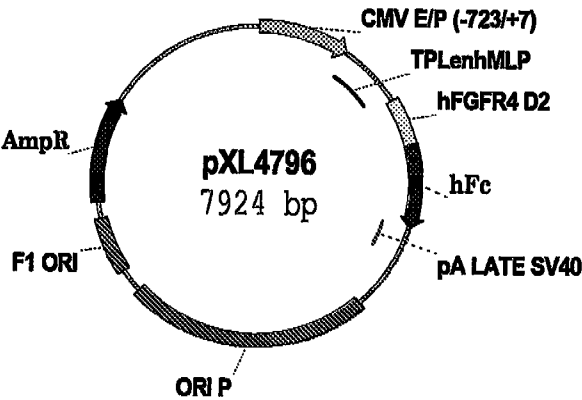


Figure 15A

|     |            |             |            |            |            |
|-----|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 1   | LEASEEVELE | PQAPYWTHPQ  | RMEKKLHAVP | AGNTVKFRCP | AAGNPTPTIR |
| 51  | WLKDGQAFHG | ENRIGGIRLR  | HQHWSLVMES | VVPSDRGTYT | CLVENAVGSI |
| 101 | RYNYLLDVLK | THTCPPCPAP  | ELLGGPSVFL | FPPKPKDTLM | ISRTPEVTCV |
| 151 | VVDVSHEDPE | VKFENWYVDGV | EVHNAKTKPR | EEQYNSTYRV | VSVLTVLHQD |
| 201 | WLNKKEYKCK | VSNKALPAPI  | EKTISKAKGQ | PREPQVYTLP | PSRDELTKNQ |
| 251 | VSLTCLVKGF | YPSDIAVEWE  | SNGQPENNYK | TTPPVLDSDG | SFFLYSKLTV |
| 301 | DKSRWQQGNV | FSCSVMHEAL  | HNHYTQKSLS | LSPG       |            |

Figure 15B

22/22

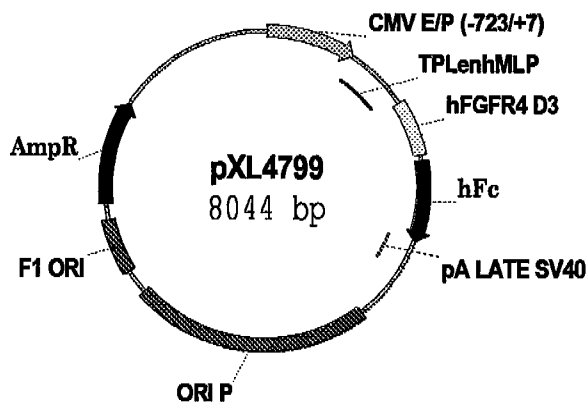


Figure 16A

|     |            |            |            |             |            |
|-----|------------|------------|------------|-------------|------------|
| 1   | LEASEEVELE | PNAVGSIRYN | YLLDVLERSP | HRPILQAGLP  | ANTTAVVGSD |
| 51  | VELLCKVYSD | AQPHIQWLKH | IVINGSSFGA | DGFPYVQVLK  | TADINSSEVE |
| 101 | VLYLRNVSAE | DAGEYTCLAG | NSIGLSYQSA | WLTIVLPEEDP | TWTAAAPEAK |
| 151 | THTCPPCPAP | ELLGGPSVFL | FPPKPKDTLM | ISRTPEVTCV  | VVDVSHEDPE |
| 201 | VKFNWYVDGV | EVHNAKTKPR | EEQYNSTYRV | VSVLTVLHQD  | WLNKEYKCK  |
| 251 | VSNKALPAPI | EKTISKAKGQ | PREPQVYTLP | PSRDELTKNQ  | VSLTCLVKGF |
| 301 | YPSDIAVEWE | SNGQPENNYK | TTPPVLDSDG | SFFLYSKLTV  | DKSRWQQGNV |
| 351 | FSCSVMHEAL | HNHYTQKSLS | LSPG       |             |            |

Figure 16B

✓

### Antagonistas específicos del receptor FGF-R4

La presente invención tiene por objeto antagonistas específicos del receptor 4 de FGF (FGF-R4) que permiten inhibir la actividad de este receptor. Estos antagonistas son en particular anticuerpos dirigidos específicamente contra el receptor 4 de FGF (FGF-R4).

La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización terapéutica de estos antagonistas, en particular en el dominio de la angiogénesis y en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

Los FGF (Factor de Crecimiento de los Fibroblastos) se consideran entre las primeras moléculas que se describe que son capaces de estimular la proliferación, migración y diferenciación de células vasculares *in vitro* e *in vivo*. Una bibliografía abundante describe la inducción de la angiogénesis y la formación de capilares sanguíneos *in vitro* e *in vivo* por los FGF. Los FGF están igualmente implicados en la angiogénesis tumoral que fomenta la formación de vasos sanguíneos reclutados por el tumor.

La familia de los FGF humanos consta de al menos 23 miembros que poseen todos un dominio central conservado de 120 aminoácidos. Ejercen su actividad biológica interactuando con sus receptores de alta afinidad de tipo tirosina-cinasa (FGF-R) y heparanos sulfato proteoglucanos, componentes presentes en la mayor parte de las superficies celulares y matrices extracelulares (sitio de unión de débil afinidad) para formar un complejo ternario. Algunos FGF presentan una alta afinidad por diversos FGF-R aunque otros activan específicamente un receptor o una isoforma de un receptor.

Se ha identificado un ligando específico de FGF-R4 por Xie et al (Cytokine, 1.999, 11:729-35.) Este ligando, denominado FGF19, es un ligando de alta afinidad por FGF-R4 exclusivamente y cuya unión al receptor depende de la heparina o de los heparanos-sulfatos. El FGF19 ha sido identificado en el animal adulto, únicamente al nivel de hepatocitos y del intestino delgado donde regula la síntesis de ácido biliar por el hígado. Será un factor de crecimiento que intervenga durante el desarrollo embrionario y estará implicado en el desarrollo del cerebro fetal en el pez cebra y en el ser humano.

Otros ligandos de FGF-R4 se describen como el FGF1 o FGF2. Estos ligandos activan considerablemente el FGF-R4 pero no son específicos de FGF-R4: se unen también a otros FGF-R (Ornitz et al., J. Biol. Chem., 1.996, 271:15.292-7).

La activación del receptor FGF-R4 conduce a diversos tipos de señalizaciones

[92]

celulares. Entre éstas, la forma más clásica que corresponde a la disposición de una vía de señalización por cascada de fosforilación a raíz de una estimulación de FGF-R4 por el FGF. Esta inducción conduce a la autofosforilación del dominio tirosina cinasa de FGF-R4 y sirve para iniciar una vía de señalización intracelular dependiente de las fosforilaciones de otras proteínas de señalización tales como AKT, p44/42, JNK etc...

5 Esta señalización por fosforilación varía según el tipo celular y según los receptores conjuntos o las moléculas de adhesión presentes en la superficie de estas células. (Cavallaro et al., *Nat. Cell Biol.* 3/7, 650-657 (2.001); Stadler et al., *Cell. Signal.* 18/6, 783-794. (2.006); Lin et al., *J Biol Chem.*, 2.007, 14:27277-84. (2.007)). Otro modo de

10 señalización importante para los FGF-R, uno de ellos FGF-R4, es la internalización del receptor después de la activación en asociación con su ligando. Este mecanismo no depende de la actividad tirosina cinasa del receptor sino de una corta secuencia en el C terminal de FGF-R4 (Klingenberg et al., *J. Cell Sci.*, 113/Pt10:1.827-1.838 (2.000)).

Se describen cuatro formas distintas de FGF-R4 en la bibliografía. Una forma

15 de tamaño pleno con 2 variantes polimórficas en la posición 388 a saber el FGF-R4 Gly388 que es la forma normal del receptor y la forma Arg388 que se describe en el ámbito de diversos tumores (Bange et al., *Cancer Res.* 62/3, 840-847 (2.002) ; Spinola et al., *J Clin Oncol* 23, 7.307-7.311 (2.005); Stadler et al., *Cell. Signal.* 18/6, 783-794. (2.006)). Se ha descubierto igualmente una forma soluble expresada en células

20 tumorales mamarias (Takaishi et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2.000, 267:658-62). Se ha descrito una cuarta forma, truncada en la parte extracelular, en algunos adenomas hipofisarios (Ezzat et al., *J Clin Invest.*, 2.002, 109:69-78).

El FGF-R4 se expresa principalmente en los tejidos derivados del endodermo tales como el tubo digestivo, páncreas, hígado, músculos y glándulas suprarrenales.

25 Se sabe en la bibliografía que el FGF-R4 tiene diversos papeles celulares, de los cuales los tres principales se describen a continuación:

Primero, este receptor está implicado en el control de diferentes procesos de diferenciación celular *in vitro* e *in vivo* como la diferenciación y la regeneración de los músculos esqueléticos, la diferenciación del tejido mesenquimatoso, osteogénesis o

30 incluso en la formación de los alveolos durante el desarrollo hepático posnatal.

Segundo, el FGF-R4 se describe en el control de la homeostasis del ácido biliar y del colesterol e intervendrá en el control de la adiposidad. Además, el equilibrio entre la producción del ácido biliar y la del colesterol está controlado por el FGF-R4 *in vitro* e *in vivo*.

35 Tercero, el FGF-R4 está implicado en algunos fenómenos tumorales como el

103

desarrollo de carcinomas hepatocelulares o tumores malignos de colon, en la proliferación de células de fibroadenomas mamarios, células epiteliales de tumores malignos mamarios, como la motilidad de células de carcinomas mamarios o colorectales. La implicación tumoral del FGF-R4 está mayoritariamente asociada a la aparición de polimorfismo (Gly388Arg) correlacionado con la aceleración de la progresión tumoral de tumores mamarios y colorectales (Bange et al., *Cancer Res.* 62/3, 840-847, 2.002), prostáticos (Wang et al., *Clin. Cancer Res.* 10/18, 6.169-6.178, 2.004) o hepáticos (Nicholes et al., *Am. J. Pathol.* 160/6, 2.295-307, 2.002). Este polimorfismo está asociado también a un mal pronóstico en el ámbito de los sarcomas (Morimoto et al., *Cancer* 98/10, 2.245-2.250, 2.003), adenocarcinomas pulmonares (Spinola et al., *J Clin Oncol* 23, 7.307-7.311, 2.005) o sarcomas escamosos (da Costa Andrade et al., *Exp Mol Pathol* 82, 53-7, 2.007). También se ha descrito la sobreexpresión de FGF-R4 en algunas líneas de tumores malignos pancreáticos (Shah et al., *Oncogene* 21/54, 8.251-61, 2.002) y se correlaciona con la malignidad de los astrocitomas (Yamada et al., *Neurol. Res.* 24/3, 244-8, 2.002). Además, la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-FGF19 en modelos *in vivo* de xenoinjertos de tumores de colon o en modelos de carcinomas hepatocelulares, muestra que la inactivación del FGF19 y luego el bloqueo de la activación de FGF-R4 puede ser beneficioso en el tratamiento de cáncer de colon o de hígado.

Se admite en la bibliografía que las parejas FGF/FGF-R1 y FGF/FGF-R2 participan en la formación de nuevos vasos sanguíneos en un contexto normal o patológico. Sin embargo, nunca se ha estudiado la potencial implicación de FGF-R4 en el control de este fenómeno celular. Hasta ahora, en efecto, se ha supuesto que la activación de la angiogénesis está mediada por FGF-R1 y/o FGF-R2 (Presta et al, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2.005, 16:159-78).

Se describen ejemplos de antagonistas de FGF-R4 en la bibliografía, especialmente: pequeñas moléculas, pero no determinan el FGF-R4 de manera específica, acarreado así efectos indeseables. Así se han descrito pequeñas moléculas químicas inhibidoras del dominio tirosina cinasa que inhiben diversos FGF-R, así como otros receptores tirosina cinasa por Thompson et al (Thompson et al *J Med Chem.*, 2.000, 43:4.200-11.). Se han descrito también pequeñas moléculas químicas inhibidoras de FGF-R por asociación a su parte extracelular en la solicitud de patente internacional WO 2007/080325.

Se han estudiado también anticuerpos como los anticuerpos anti-FGFR1 y/o anti-FGFR4 descritos en las solicitudes de patente internacional WO 2005/066211 y

104

WO 2008052796 o por Chen et al (*Hybridoma* 24/3, 152-159, 2.005). La solicitud de patente internacional WO 2005/037235 describe anticuerpos antagonistas de FGF-R para el tratamiento de la obesidad y la diabetes. Por otra parte, se describen anticuerpos anti-FGF-R4 agonistas en la solicitud de patente internacional WO 03/063893.

La presente invención tiene por objeto un antagonista del receptor FGF-R4, caracterizado por que se une específicamente a éste.

De manera ventajosa, dicho antagonista es un anticuerpo específico del receptor FGF-R4.

En un modo de realización, el antagonista objeto de la invención se une al dominio D2-D3 del receptor FGF-R4. En un modo de realización ventajoso, el antagonista objeto de la invención se une al dominio D2 del receptor FGF-R4. En un modo incluso más ventajoso, el antagonista se une a la secuencia SEC ID N° 70.

De manera ventajosa el antagonista específico del receptor FGF-R4 tiene un  $K_D$  en comparación con el receptor FGF-R4 determinado por la técnica Biacore inferior a  $10E-8$  M, inferior a  $5 \times 10E-9$  M, inferior a  $2 \times 10E-9$  M o inferior a  $1 \times 10E-9$  M.

En un modo de realización ventajoso el antagonista específico del receptor FGF-R4 es activo a la vez contra FGF-R4 humano y FGF-R4 murino.

En otro modo de realización ventajoso el antagonista específico del receptor FGF-R4 es activo a la vez contra FGF-R4 humano, FGF-R4 murino y FGF-R4 de rata.

En un modo de realización ventajoso, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende al menos una CDR que presenta una secuencia idéntica a SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ó 110 o al menos una CDR cuya secuencia difiera en uno a dos aminoácidos con respecto a las secuencias SEC ID N° 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ó 110, siempre que los anticuerpos mantengan su especificidad de unión.

En un modo de realización particularmente ventajoso, los anticuerpos antagonistas específicos del receptor FGF-R4 comprenden CDR de secuencia SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ó 110 o CDR cuyas secuencias difieren en uno a dos aminoácidos con respecto – respectivamente – a las secuencias ya citadas, siempre que eso no modifique la especificidad de unión de los anticuerpos al receptor FGF-R4.

En un modo de realización ventajoso, los anticuerpos de la invención

105

comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, comprendiendo dicha cadena pesada tres secuencias, teniendo CDR las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 9, 10 y 11 ó 73, 74 y 75, 83, 84 y 85 ó 93, 94 y 95 ó 103, 104 y 105, comprendiendo dicha cadena  
5 ligera tres secuencias, teniendo CDR las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 12, 13 y 14 ó 78, 79 y 80 ó 88, 89 y 90 ó 98, 99 y 100 ó 108, 109 y 110.

En un modo de realización ventajoso las partes variables de la cadena pesada de los anticuerpos antagonistas específicos del receptor FGF-R4 comprenden una  
10 secuencia que presenta al menos el 80%, 90%, 95% o 99% de identidad con la secuencia SEC ID N°: 6, 77, 87, 97 ó 107.

En un modo de realización ventajoso las partes variables de la cadena ligera del anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 comprenden una secuencia que presenta al menos el 80%, 90%, 95% o 99% de identidad con la secuencia SEC  
15 ID N°: 8, 72, 82, 92 ó 102.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena pesada que comprende una parte variable codificada por una secuencia nucleotídica que presenta una identidad de al menos 80%, 90%, 95% o 99% con la secuencia SEC ID N°: 5, 76, 86,  
20 96 ó 106.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena ligera que comprende una parte variable codificada por una secuencia nucleotídica que presenta una identidad de al menos 80%, 90%, 95% o 99% con la secuencia SEC ID N°: 7, 71, 81, 91 ó 101.

25 La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena pesada que comprende una parte variable de secuencia polipeptídica SEC ID N°: 6, 77, 87, 97 ó 107.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena ligera que comprende una  
30 parte variable de secuencia polipeptídica SEC ID N°: 8, 72, 82, 92 ó 102.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende secuencias codificadas por las secuencias nucleotídicas SEC ID N°: 5 y 7 ó 71 y 76 ó 81 y 86 ó 91 y 96 ó 101 y 106.

35 La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende las secuencias polipeptídicas SEC ID

108

Nº: 6 y 8 ó 72 y 77 ó 82 y 87 ó 92 y 97 ó 102 y 107.

En un modo de realización ventajoso el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende secuencias idénticas a al menos el 80%, 90%, 95% o 99% de la SEC ID Nº: 2 y/o SEC ID Nº: 4 o SEC ID Nº: 72 y/o SEC ID Nº: 77 o SEC ID  
5 Nº: 82 y/o SEC ID Nº: 87 o SEC ID Nº: 92 y/o SEC ID Nº: 97 o SEC ID Nº: 102 y/o SEC ID Nº: 107.

En un modo de realización particularmente ventajoso, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende una cadena pesada codificada por una secuencia nucleotídica idéntica al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia  
10 SEC ID Nº 1.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista del receptor FGF-R4 que comprende una cadena pesada de secuencia polipeptídica idéntica al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia SEC ID Nº 2.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena ligera codificada por una secuencia nucleotídica idéntica al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia  
15 SEC ID Nº 3.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena ligera de secuencia polipeptídica idéntica al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia SEC ID Nº 4.  
20

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende las secuencias codificadas por las secuencias nucleotídicas SEC ID Nº : 1 y 3.

En un modo incluso más ventajoso, el anticuerpo antagonista específico de FGF-R4 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEC ID Nº 2 y una cadena ligera que comprende la secuencia SEC ID Nº 4.  
25

El anticuerpo compuesto por una cadena pesada de secuencia SEC ID Nº 2 y una secuencia ligera SEC ID Nº 4 se denominará 40-12 en la solicitud.

En un modo de realización de la invención, los anticuerpos específicos de FGF-R4 son activos a la vez contra FGF-R4 humano, FGF-R4 murino y FGF-R4 de rata.  
30

En un modo de realización ventajoso, el antagonista específico del receptor FGF-R4 induce una inhibición de las vías celulares AKT/p38.

En un modo de realización ventajoso, el antagonista específico del receptor FGF-R4 induce una inhibición de las vías celulares Erk1/2.

35 En un modo de realización ventajoso, el antagonista específico del receptor

1/5

FGF-R4 induce una inhibición de las vías de señalización celular controladas por FGF-R4.

En otro modo de realización ventajoso, el antagonista específico del receptor FGF-R4 induce una inhibición de la proliferación celular tumoral.

- 5 En otro modo más de realización ventajoso, el antagonista específico del receptor FGF-R4 induce una inhibición de la angiogénesis.

En otro modo de realización particularmente ventajoso, el antagonista específico del receptor FGF-R4 presenta una afinidad por FGF-R4 10 veces superior a su afinidad por los otros receptores por FGF.

- 10 En un modo de realización particularmente ventajoso, el anticuerpo según la invención es un anticuerpo humanizado antagonista específico del receptor FGF-R4.

En un modo de realización el anticuerpo humanizado antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende una cadena ligera cuya parte variable está codificada por una secuencia nucleotídica idéntica al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia

- 15 SEC ID N° 29 o a la secuencia SEC ID N° 31.

En otro modo de realización el anticuerpo humanizado antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende una cadena ligera cuya parte variable es idéntica al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia SEC ID N° 30 o a la secuencia SEC ID N° 32.

- 20 En otro modo de realización, el anticuerpo humanizado antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende una cadena ligera cuya parte variable está codificada por una secuencia idéntica a la secuencia nucleotídica SEC ID N° 29 o a la secuencia SEC ID N°: 31.

- 25 La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humanizado antagonista específico del receptor FGF-R4, que comprende una cadena pesada cuya parte variable está codificada por una secuencia idéntica al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia SEC ID N° 33, a la secuencia SEC ID N° 35 o a la secuencia SEC ID N° 37.

- 30 La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humanizado antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena pesada cuya parte variable es idéntica al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia SEC ID N° 34, a la secuencia SEC ID N° 36 o a la secuencia SEC ID N° 38.

- 35 La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humanizado antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena pesada codificada por una secuencia nucleotídica SEC ID N° 33 y/o SEC ID N°: 35 y/o SEC ID

108

Nº: 37.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humanizado antagonista específico del receptor FGF-R4 cuyas secuencias humanizadas de secuencia SEC ID Nº: 30 ó 32 se utilizan en combinación con las secuencias humanizadas de secuencia SEC ID Nº: 34, 36 ó 38.

En otro modo de realización, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende las CDR de secuencia SEC ID Nº: 73, 74, 75, 78, 79 y 80 o las CDR cuyas secuencias difieren en uno a dos aminoácidos con respecto – respectivamente – a las secuencias citadas antes, siempre que eso no modifique la especificidad de unión del anticuerpo al receptor FGF-R4.

En otro modo de realización, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende las CDR de secuencia SEC ID Nº: 83, 84, 85, 88, 89 y 90 o las CDR cuyas secuencias difieren en uno a dos aminoácidos con respecto – respectivamente - a las secuencias citadas antes, siempre que eso no modifique la especificidad de unión del anticuerpo al receptor FGF-R4.

En otro modo de realización, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende las CDR de secuencia SEC ID Nº: 93, 94, 95, 98, 99 y 100 o las CDR cuyas secuencias difieren en uno a dos aminoácidos con respecto – respectivamente - a las secuencias citadas antes, siempre que eso no modifique la especificidad de unión del anticuerpo al receptor FGF-R4.

En otro modo de realización, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende las CDR de secuencia SEC ID Nº: 103, 104, 105, 108, 109 y 110 o las CDR cuyas secuencias difieren en uno a dos aminoácidos con respecto – respectivamente – a las secuencias citadas antes, siempre que eso no modifique la especificidad de unión del anticuerpo al receptor FGF-R4.

En un modo de aplicación preferido de la invención, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende las CDR de secuencia SEC ID Nº: 83, 84, 85, 88, 89 y 90.

En un modo de realización ventajosa, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 es un anticuerpo humano cuyas partes variables de la cadena pesada comprenden una secuencia nucleotídica que presenta al menos el 80%, 90%, 95% o 99% de identidad con la secuencia SEC ID Nº: 76, 86, 96 ó 106.

En un modo de realización ventajoso, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 es un anticuerpo humano cuyas partes variables de la cadena ligera comprenden una secuencia nucleotídica que presenta al menos el 80%, 90%, 95% o

10

99% de identidad con la secuencia SEC ID N°: 71, 81, 91 ó 101.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4, que comprende una cadena pesada que comprende una parte variable codificada por una secuencia proteica que presenta una  
5 identidad de al menos 80%, 90%, 95% o 99% con la secuencia SEC ID N°: 77, 87, 97 ó 107.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena ligera que comprende una parte variable codificada por una secuencia proteica que presenta una  
10 identidad de al menos 80%, 90%, 95% o 99% con la secuencia SEC ID N°: 72, 82, 92 ó 102.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4, que comprende las secuencias codificadas por las secuencias nucleotídicas SEC ID N°: 71 y 76 o las secuencias  
15 nucleotídicas SEC ID N°: 81 y 86 o las secuencias nucleotídicas SEC ID N°: 91 y 96 o las secuencias nucleotídicas SEC ID N°: 101 y 106.

La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4, que comprende las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 72 y 77 o las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 82 y 87 o  
20 las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 92 y 97 o las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 102 y 107.

En un modo de realización ventajoso, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende secuencias idénticas al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la SEC ID N°: 72 y/o SEC ID N°: 77.

25 En otro modo de realización ventajoso, el anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende secuencias idénticas al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la SEC ID N°: 82 y/o SEC ID N°: 87.

En otro modo de realización ventajoso, el anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende secuencias idénticas al menos al 80%,  
30 90%, 95% o 99% a la SEC ID N°: 92 y/o SEC ID N°: 97.

En otro modo de realización ventajoso, el anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4 comprende secuencias idénticas al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la SEC ID N°: 102 y/o SEC ID N°: 107.

En un modo de realización preferido, la presente invención tiene por objeto un  
35 anticuerpo antagonista humano específico del receptor FGF-R4, que comprende una

110

cadena ligera codificada por una secuencia nucleotídica idéntica al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia SEC ID N° 82 y que comprende una cadena ligera de secuencia polipeptídica idéntica al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia SEC ID N° 87.

- 5 De manera incluso más preferida, la presente invención tiene por objeto un anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende las secuencias codificadas por las secuencias nucleotídicas SEC ID N°: 82 y 87.

El anticuerpo formado por una cadena pesada de secuencia SEC ID N° 77 y una secuencia ligera SEC ID N° 72, se denominará clon 8 en la solicitud.

- 10 El anticuerpo formado por una cadena pesada de secuencia SEC ID N° 87 y una secuencia ligera SEC ID N° 82, se denominará clon 31 en la solicitud.

El anticuerpo formado por una cadena pesada de secuencia SEC ID N° 97 y una secuencia ligera SEC ID N° 92, se denominará clon 33 en la solicitud.

- 15 El anticuerpo formado por una cadena pesada de secuencia SEC ID N° 107 y una secuencia ligera SEC ID N° 102, se denominará clon 36 en la solicitud.

El campo de la presente invención no se limita a los anticuerpos que comprenden estas secuencias. En efecto, todos los anticuerpos que se unen de manera específica a FGF-R4, teniendo una acción antagonista sobre este receptor, entran en el campo de la presente invención.

- 20 La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4, conjugado a un agente citotóxico.

La presente invención tiene por objeto la utilización de un antagonista específico del receptor FGF-R4, en el tratamiento de enfermedades asociadas a la angiogénesis.

- 25 La presente invención tiene por objeto la utilización de un antagonista específico del receptor FGF-R4, en el tratamiento de un cáncer.

La presente invención tiene por objeto la utilización de un antagonista específico del receptor FGF-R4 en el tratamiento de hepatocarcinomas o de cualquier otro tipo de cáncer hepático.

- 30 La presente invención tiene por objeto la utilización de un antagonista específico del receptor FGF-R4 en el tratamiento de cáncer de páncreas.

La presente invención tiene por objeto un anticuerpo específico del receptor FGF-R4 útil a la vez en el tratamiento de enfermedades asociadas a la angiogénesis y en el tratamiento de hepatocarcinomas o de cualquier otro tipo de cáncer hepático.

- 35 La presente invención tiene por objeto un anticuerpo específico del receptor

FGF-R4 útil a la vez en el tratamiento de enfermedades asociadas a la angiogénesis, en el tratamiento de hepatocarcinomas o de cualquier otro tipo de cáncer hepático, en el tratamiento de cáncer de páncreas, órganos del tubo digestivo u cualquier otro órgano que exprese FGF-R4.

- 5 La presente invención tiene por objeto una composición farmacéutica que comprende un antagonista específico del receptor FGF-R4 y excipientes.

La presente invención tiene por objeto un método de tratamiento de un cáncer que comprende la administración al paciente de un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4.

- 10 La presente invención tiene por objeto un método de tratamiento de una enfermedad asociada a un aumento patológico de la angiogénesis, que comprende la administración al paciente de un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4.

- 15 La presente invención tiene por objeto un procedimiento de selección de un anticuerpo monoclonal antagonista específico del receptor FGF-R4, que comprende las etapas siguientes:

- a. inmunización en el ratón
- b. extracción de nódulos linfáticos en el ratón y
- c. cribado de sobrenadantes de hibridomas

- 20 La presente invención tiene por objeto una línea celular que produce anticuerpos antagonistas específicos del receptor FGF-R4.

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de producción de un anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4, que comprende poner en cultivo una línea celular que produzca anticuerpos antagonistas del receptor FGF-R4.

- 25 La presente invención tiene por objeto un medicamento que comprende un antagonista específico del receptor FGF-R4.

- La presente invención tiene igualmente por objeto un polinucleótido que codifique un polipéptido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N<sup>os</sup>: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 30, 32, 34, 36, 38, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 30 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 109, 110 y secuencias idénticas al menos al 80%, 90%, 95% o 99% a una de estas secuencias.

La presente invención tiene por objeto un vector recombinante que comprenda un polinucleótido tal como se describió anteriormente o que codifique un polipéptido tal como se describió anteriormente.

- 35 Con el fin de permitir la expresión de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras del

anticuerpo antagonista del receptor FGF-R4, objeto de la invención, los polinucleótidos que codifican dichas cadenas se insertan en los vectores de expresión. Estos vectores de expresión pueden ser plásmidos, los YAC, cósmidos, retrovirus, episomas derivados de EBV (virus de Epstein-Barr, por sus siglas en inglés) y todos los vectores  
5 que el experto en la materia puede juzgar apropiados para la expresión de dichas cadenas.

La presente invención tiene por objeto una célula anfitriona que comprenda un vector recombinante tal como se describió anteriormente.

#### **Descripción detallada de la invención**

10 La presente invención tiene por objeto la utilización de un anticuerpo dirigido específicamente contra FGF-R4 (sin reacción cruzada con FGF-R1, R2 o R3) para la inhibición de la angiogénesis y del crecimiento tumoral.

De manera inesperada, los autores han demostrado que el FGF-R4 desempeña un papel activo y específico en el control de la angiogénesis.

15 Esta función del FGF-R4 no había sido demostrada nunca o propuesta antes. Por consiguiente, este receptor puede ser utilizado como blanco para tratar las patologías que presenten una disfunción angiogénica. Los ligandos del FGF-R4 capaces de modular su actividad son pues agentes terapéuticos potenciales para las numerosas patologías unidas a la angiogénesis.

20 La presente invención puede ser pues utilizada en el tratamiento de todas las patologías que impliquen una desregulación de la angiogénesis y que necesiten una inhibición de ésta. Las patologías concernientes pueden ser el cáncer, con la utilización de antagonistas según la invención como inhibidores de la angiogénesis tumoral o las patologías para las cuales se describe una desregulación de la  
25 angiogénesis como: la degeneración macular relacionada con la edad o DMLA (por sus siglas en inglés), enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, osteoartritis, colitis, úlceras o cualquier enfermedad inflamatoria de los intestinos, aterosclerosis o incluso en el tratamiento de la obesidad.

La utilización de estos anticuerpos también se ilustra en la inhibición del  
30 crecimiento tumoral. Los antagonistas según la presente invención pueden ser utilizados pues para el tratamiento de ciertos tumores malignos que impliquen la desregulación del FGF-R4 y más en particular los tumores malignos de hígado, colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, piel o esófago.

Una de las mayores ventajas de los antagonistas según la presente invención  
35 es determinar específicamente un receptor de los FGF, en este caso FGF-R4. Esta

W3

especificidad permite limitar los efectos indeseables que pueden tener las moléculas químicas pequeñas inhibitoras del dominio tirosina cinasa. Además, no expresándose el FGF-R4 de manera ubicua, sino expresándose especialmente en células endoteliales como en células hepatocitarias, biliares, mamarias, prostáticas, de los ovarios, pancreáticas, renales, se dispone de un modo de tratamiento de enfermedades unidas a una desregulación de la actividad FGF-R4 que limite los efectos secundarios.

Por « antagonista », se entiende todo ligando capaz de disminuir o inhibir totalmente la actividad del FGF-R4. Este compuesto antagonista se denomina también inhibidor de FGF-R4.

Este antagonista puede ser cualquier ligando de FGF-R4 tal como una molécula química, una proteína recombinante, un oligosacárido, un polisacárido, un oligonucleótido o un anticuerpo capaz de unirse de manera específica al receptor FGF-R4, con exclusión de cualquier otro FGFR.

Un objeto de la invención es pues un antagonista específico de FGF-R4. Según la invención, se entiende que un antagonista que se une específicamente al FGF-R4 es un ligando que no se une a los otros receptores de los FGF a saber FGF-R1, FGF-R2 o FGF-R3. En particular, un anticuerpo específico de FGF-R4 es un anticuerpo que no presenta reacción cruzada con FGF-R1, FGF-R2 o FGF-R3.

Se entiende una unión específica una diferencia de un factor al menos 10 entre la intensidad de la unión a un receptor con respecto a otro, aquí entre la unión al FGF-R4 y las uniones posibles a FGF-R1, FGF-R2 o FGF-R3.

En un modo de realización de la invención, el ligando de FGF-R4 es un oligosacárido o un polisacárido.

Se entiende que un oligosacárido es todo polímero de sacárido que contenga de tres a diez unidades de azúcar simples. Existen oligosacáridos naturales, como por ejemplo los fructo-oligosacáridos (FOS) y los oligosacáridos de síntesis como por ejemplo los anti-trombóticos miméticos de la heparina.

Por « polisacárido », se entiende todo polímero constituido además por diez monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos. Existen polisacáridos naturales, como por ejemplo los mucopolisacáridos, fucoides, carragenanos, exopolisacáridos bacterianos y los polisacáridos de síntesis. Así, los fucoidanos de pesos moleculares bajos o los exopolisacáridos muy sulfatados han demostrado actividades pro-angiogénicas (Chabut et al., *Mol Pharmacol.*, 2.003, 64:696-702; Matou et al., *Biochem Pharmacol.*, 2.005, 69:751-9.). A la inversa, los oligosacáridos



ligeramente sulfatados derivados de la heparina o el sulfato de fosfomanopentosa pueden presentar características antiangiogénicas (Parish et al., 1.999, 15:3.433-41; Casu et al., *J Med Chem.*, 2.004, 12:838-48)

5 En un modo de realización de la invención, el ligando de FGF-R4 es un anticuerpo.

Por «anticuerpo», se entiende todo tipo de anticuerpos o moléculas derivadas tales como los anticuerpos policlonales y monoclonales. Entre las moléculas derivadas de los anticuerpos monoclonales, se incluyen los anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos, 10 fragmentos de anticuerpos, nanocuerpos...

En un modo de realización de la invención, el antagonista específico de FGF-R4 es un anticuerpo policlonal.

Un «anticuerpo policlonal» es un anticuerpo que se ha producido entre una mezcla de anticuerpos que proceden de varios clones de linfocitos B y que reconoce 15 una serie de epítomos diferentes.

En un modo de realización ventajoso, el antagonista específico de FGF-R4 es un anticuerpo monoclonal.

Un «anticuerpo monoclonal» es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos substancialmente homogénea resultante de un solo tipo de 20 linfocitos B amplificada de manera clonal. Los anticuerpos que forman esta población son idénticos excepto las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en una cantidad muy reducida. Estos anticuerpos se dirigen contra un solo epítomo y son pues altamente específicos.

Por «epítomo» se entiende el sitio del antígeno al que se une el anticuerpo. Si el 25 antígeno es un polímero, tal como una proteína o un polisacárido, el epítomo puede estar formado por restos contiguos o no contiguos.

En un modo de realización ventajoso de la invención, el anticuerpo antagonista anti-FGF-R4 se une a un epítomo perteneciente al dominio D2-D3 del receptor del FGF-R4.

30 En un modo incluso más ventajoso, el anticuerpo se une a un epítomo comprendido en el dominio que comprende los aminoácidos 144 a 365 del receptor del FGF-R4.

En un modo incluso más ventajoso, el anticuerpo se une a un epítomo comprendido en el dominio D2 del receptor del FGF-R4, correspondiendo este epítomo 35 a los aminoácidos 145 a 242 descritos en la secuencia SEC ID N° 70.

Un anticuerpo, también denominado inmunoglobulina, está compuesto por dos cadenas pesadas idénticas («VH») y dos cadenas ligeras idénticas («VL») que se unen por un puente disulfuro. Cada cadena contiene una región constante y una región variable. Cada región variable comprende tres segmentos denominados

5 «regiones que determinan la complementariedad» («las CDR, por sus siglas en inglés») o «regiones hipervariables», que son principalmente responsables de la unión al epítipo de un antígeno.

La terminología «VH» hace referencia a las regiones variables de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo las cadenas pesadas de un

10 fragmento Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' o F(ab)'.

La terminología «VL» hace referencia a las regiones variables de una cadena ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo las cadenas ligeras de un fragmento Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' o F(ab)'.

Por «fragmento de anticuerpo» se entiende toda parte de éste: Fab (unión

15 Fragmento antígeno), Fv, scFv (Fv de cadena sencilla), Fc (Fragmento cristizable). Preferentemente, estos fragmentos funcionales serán fragmentos de tipo Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc o díacuerpos que poseen en general la misma especificidad de fijación que el anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado que resulta. Según la presente invención, los fragmentos de anticuerpos de la invención se

20 pueden obtener a partir de anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados, por métodos tales como la digestión por enzimas, como la pepsina o la papaína y/o por escisión de puentes disulfuro por reducción química.

Por «regiones CDR o las CDR», se entiende designar las regiones hipervariables de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, como se define por

25 Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5ª Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1.991 y ediciones posteriores). Existen 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. La terminología CDR o las CDR se utiliza en la presente memoria para designar siguiendo el caso, una de estas regiones o varias, incluso el conjunto, de estas regiones que contienen la

30 mayoría de los restos de aminoácidos responsables de la unión afín del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce. Las regiones más conservadas de los dominios variables se denominan regiones o secuencias FR para «estructura» o regiones «armazones».

En otro modo de realización de la invención, el antagonista específico de FGF-

35 R4 es un anticuerpo quimérico.

W4

Por «anticuerpo quimérico» se entiende un anticuerpo en el que la región constante o una porción de ésta, se modifica, se reemplaza o se cambia, tal que la región variable está unida a una región constante de una especie diferente o pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos.

- 5 Se entiende igualmente por «anticuerpo quimérico» un anticuerpo en el que la región variable o una porción de ésta, se modifica, se reemplaza o se cambia, tal que la región constante está unida a una región variable de una especie diferente o pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos.

Los métodos de producción de anticuerpos quiméricos son conocidos para el  
10 experto en la materia. Véase por ejemplo, Morrison, 1.985, *Science*, **229**:1.202; Oi et al., 1.986, *Bio Techniques*, 4:214; Gillies et al., 1.989, *J. Immunol. Methods*, **125**:191-202; patentes de EE.UU. Nos. 5.807.715 ; 4.816.567 y 4.816.397.

Estas versiones quiméricas de anticuerpos pueden consistir en la fusión de partes variables VL y VH a las partes constantes de Ckappa y CH (IgG1) de origen  
15 humano para generar un anticuerpo monoclonal quimérico.

La parte CH (IgG1) también se puede modificar por mutaciones puntuales para aumentar la afinidad del fragmento Fc por el receptor FcγRIIIa y por la misma aumentar las funciones eficaces de los anticuerpos (Lazar et al., 2.006, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 103: 4.005-4.010; Stavenhagen et al., 2.007, *Cancer Res.* **67**:  
20 8.882-8.890).

La presente invención incluye las versiones humanizadas de los anticuerpos.

Por «anticuerpo humanizado» se entiende un anticuerpo que contiene principalmente secuencias humanas de la inmunoglobulina. Esta terminología hace referencia en general a una inmunoglobulina no humana que ha sido modificada por  
25 incorporación de secuencias humanas o de restos encontrados en las secuencias humanas.

En general, los anticuerpos humanizados comprenden uno o típicamente dos dominios variables en los que todo o parte de las regiones CDR corresponden a partes resultantes de la secuencia de la misma familia, no humana y en los que todo o parte  
30 de las regiones FR son las resultantes de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender entonces al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), en particular la de inmunoglobulina humana de la referencia elegida.

Se busca también obtener un anticuerpo que sea inmunógeno como mínimo en  
35 un ser humano. Así, es posible que uno o dos aminoácidos de una o varias CDR se

modifiquen por un aminoácido menos inmunógeno para el anfitrión humano, ésto sin reducir sustancialmente la especificidad de unión del anticuerpo al FGF-R4. Del mismo modo, los restos de las regiones armazones pueden no ser humanos y es posible que no estén modificados ya que no contribuyen al potencial inmunogénico del anticuerpo.

5           Existen varios métodos de humanización conocidos por el experto en la materia para modificar un anticuerpo padre, no humano, en un anticuerpo menos inmunógeno para el ser humano. No es forzosamente necesaria una identidad global de las secuencias con un anticuerpo humano. En efecto, la identidad global de secuencia no es necesariamente un indicador predictivo de una inmunogenicidad reducida y la  
10       modificación de un número limitado de restos puede conducir a los anticuerpos humanizados que presenten un potencial inmunogénico muy atenuado en el hombre (Molecular Immunology (2.007) 44, 1.986-1.998).

Diversos métodos son por ejemplo la inclusión de las CDR (injerto) (patente europea EPO 0 239 400; patente internacional WO 91/09967 y patente de EE.UU. N°  
15       5.530.101 y 5.585.089), la preparación de nuevo (patente europea EPO 0 592 106; patente europea EPO 0 519 596; Padlan, 1.991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1.994, Prot Eng 7(6):805-814 y Roguska et al., 1.994, PNAS 91:969-973) o incluso la mezcla de cadenas (patente de EE.UU. N° 5.565.332).

La presente invención se refiere en particular a los anticuerpos humanizados  
20       cuyas partes variables son modificadas según la siguiente tecnología:

Las cadenas ligeras y pesadas más similares a las cadenas correspondientes del anticuerpo murino anti-FGF-R4 40-12 son identificadas por comparación con el Banco de Datos de Proteínas (H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. Nucleic Acids Research, 2.000,  
25       28:235-242). La alineación de secuencias utiliza el algoritmo BLAST (J Mol Biol. 1.990 Oct 215:403-410). Se trata de estructuras tridimensionales que responden a los códigos PDB 1NDM y 1ETZ, que se han utilizado respectivamente para construir los modelos por homología de cadenas ligeras y pesadas de dominios variables. Estos modelos tridimensionales se afinan a continuación minimizando su energía potencial  
30       con el procedimiento estándar implementado en el programa MOE (Entorno de Operación Molecular, por sus siglas en inglés, Chemical Computing Group, Quebec, Canadá). Se realiza después una simulación de dinámica molecular (DM) a partir de estos modelos tridimensionales minimizados del anticuerpo con el programa Amber (D. A. Case, T. E. Cheatham, III, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, Jr., A.  
35       Onufriev, C. Simmerling, B. Wang y R. Woods. J. Computat. Chem. 2.005, 26:1.668-

YR8

- 1.688). Esta simulación tiene lugar con las tensiones armónicas aplicadas a los átomos del esqueleto proteico a una temperatura de 500 K, durante un tiempo de 1,1 nanosegundos, en un modelo de disolvente implícito tal que se implementa en el método generalizado de Born (Gallicchio & Levy, J Comput Chem 2.004, 25:479-499).
- 5 Se extraen así diez conformaciones diversas de esta primera simulación a razón de una conformación tridimensional cada cien picosegundos durante el último nanosegundo de la simulación. Estas diez diversas conformaciones se someten cada una a continuación a una simulación de dinámica molecular, sin tensiones sobre el esqueleto proteico, a una temperatura de 27 °C, durante 2,3 nanosegundos, en un
- 10 modelo de disolvente implícito tal que se implementa en el método generalizado de Born. Las uniones que implican un átomo de hidrógeno son tensiones con el algoritmo SHAKE (Barth. et al., J Comp Chem, 1.995, 16:1.192-1.209), el paso es de 1 femto segundo y la simulación tiene lugar según la ecuación de Langevin a volumen constante y una temperatura constante de 27°C. Para cada una de las diez
- 15 simulaciones de dinámica molecular, las últimas dos mil conformaciones extraídas a la frecuencia de un par de picosegundos, se utilizan a continuación para cuantificar para cada aminoácido del anticuerpo que se tiene que humanizar, la desviación de las posiciones de los átomos con respecto a una conformación media, denominada medoide, del aminoácido. El conjunto del análisis descrito anteriormente se realiza con
- 20 el lenguaje script Scientific Vector Language (SVL) del programa MOE. La conformación medoide del aminoácido es la conformación resultante de la dinámica molecular que es la más próxima de la conformación media calculada a partir de la posición de los átomos de todas las conformaciones del aminoácido. La distancia utilizada para detectar la conformación medoide es la desviación cuadrática media de
- 25 las distancias escalares entre los átomos de dos conformaciones del aminoácido. De manera similar, la desviación de las posiciones de los átomos de una conformación de un aminoácido con respecto a la conformación medoide se cuantifica calculando la desviación cuadrática media de las distancias escalares entre los átomos del aminoácido de una conformación de la simulación y los mismos átomos de la
- 30 conformación medoide. A continuación, es comparando la desviación cuadrática media de las posiciones de los átomos de un aminoácido dado (i) promediado sobre el conjunto de diez simulaciones de dinámica molecular (Fi), a la desviación cuadrática media de las posiciones de todos los aminoácidos del anticuerpo promediado sobre el conjunto de diez simulaciones de dinámica molecular (Fm) como se decide si el
- 35 aminoácido es bastante flexible para ser considerado que puede interactuar

(14)

potencialmente con los receptores de células T y provocar la activación del sistema inmunitario. Un aminoácido  $i$  se considera flexible si presenta un resultado de flexibilidad  $Z_i$  por encima de 0,15 tal como se definió anteriormente:  $Z_i = (F_i - F_m)/F_m$ . Se identifican así 45 aminoácidos como flexibles en el dominio variable del anticuerpo, con exclusión de la región que determina la complementariedad al antígeno (RDC) y de su entorno inmediato. Se define el entorno inmediato de la RDC como todo aminoácido cuyo carbono alfa se sitúa a una distancia de 5 angströms (Å) o menos de un carbono alfa de la RDC.

Los movimientos de los 60 aminoácidos más flexibles del anticuerpo, durante los 20 nanosegundos (10x2ns) de simulación, se comparan a continuación con los movimientos de los aminoácidos correspondientes de 49 modelos por homología de secuencias germinales humanas de anticuerpo, para cada uno de los cuales las diez simulaciones de dinámica molecular (10x2ns) se han realizado según el mismo modo de operación. Los 60 aminoácidos más flexibles excluyen la región que determina la complementariedad al antígeno (RDC) y su entorno inmediato. Los 49 modelos humanos de secuencias germinales del anticuerpo se han construido combinando sistemáticamente las 7 cadenas ligeras humanas más frecuentes (vk1, vk2, vk3, vk4, vlamba1, vlamba2, vlamba3) y las 7 cadenas pesadas humanas más frecuentes (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) (Nucleic Acids Research, 2.005, Vol. 33, Database issue D593-D597).

La similitud del anticuerpo que se tiene que humanizar con los 49 modelos de secuencias humanas germinales se cuantifica preparando un muestreo de las posiciones de algunos átomos de los 60 aminoácidos flexibles de un anticuerpo, durante las diez dinámicas moleculares, mediante una misma representación cúbica tridimensional de resolución 1Å. Se habla de similitud cuadridimensional. La representación tridimensional utilizada conlleva 445.740 puntos y se inicia a partir de la estructura tridimensional del anticuerpo humano que responde al código PDB 8FAB. La estructura 8FAB se utiliza así para posicionar todas las conformaciones de un anticuerpo que se tiene que preparar para muestreo en la representación tridimensional. Se superpone para esto hacer la conformación medoide de la dinámica molecular del anticuerpo en la estructura 8FAB. Esta superposición consiste en la alineación de los momentos de inercia de dos conformaciones, seguido por la optimización de las distancias escalares entre los átomos de carbono alfa de las dos conformaciones. Todas las demás conformaciones de la dinámica molecular del anticuerpo se superponen sobre la conformación medoide según el mismo método. Se

realizan dos tipos de muestreo dando como resultado dos similitudes (similitud electrostática y similitud lipófila), para un par de anticuerpos que se tengan que comparar, que se suman para obtener la similitud total. El primer muestreo, electrostático, considera todos los átomos de la cadena lateral del aminoácido. Se calcula el valor en un punto x de la representación aplicando a los átomos de la cadena lateral del aminoácido una función gaussiana tridimensional f(x) que se pondera con la carga electrostática del átomo tal como se describe en el campo de fuerza Amber99 (Cieplak, J., et al.; J. Comp. Chem. 2.001, 22:1.048-1.057). La función f(x) se aplica según los 3 ejes de coordenadas cartesianas y responde a la fórmula:

10 
$$f(x) = (s\sqrt{2\pi})^{-3} \times \exp\left(\frac{-(x-u)^2}{2s^2}\right),$$
 con x y u respectivamente, coordenadas

cartesianas de un punto x de la representación y un átomo del muestreo, s= r/1,6 (r = radio de covalencia del átomo). El muestreo se repite para todas las conformaciones del aminoácido y los resultados obtenidos son medias en todo punto x de la representación tridimensional. El segundo muestreo, lipófilo, considera únicamente los átomos lipófilos de la cadena lateral del aminoácido. El valor en un punto x de la representación se calcula con ayuda de la misma función gaussiana f(x) sin ponderación. Los dos grupos de conformaciones de las dinámicas moleculares de dos anticuerpos que se comparan se muestrean así por la misma representación tridimensional. Se mide la similitud electrostática (sim-elec), entre 2 anticuerpos a y b,

20 con ayuda de la siguiente fórmula: 
$$sim - elec = \frac{\sum_{i=1}^{445740} \left( |x_i^a + x_i^b| - |x_i^a - x_i^b| \right)}{\sum_{i=1}^{445740} \left( |x_i^a + x_i^b| \right)}.$$
 La similitud

lipófila se calcula con la misma fórmula sobre los resultados dados del muestreo lipófilo descrito anteriormente.

El modelo de secuencias germinales humanas vlambda2-vh2 muestra así la similitud cuadridimensional más importante (similitud total = 58 %) de estos 60 aminoácidos flexibles con respecto a los aminoácidos flexibles del anticuerpo murino 40-12. El modelo de secuencia germinal humana vlambda2-vh2 ha sido utilizado pues para humanizar el anticuerpo que se tenía que humanizar centrándose en los 45 aminoácidos flexibles. Para determinar las mutaciones que se tienen que realizar, la estructura tridimensional del modelo del anticuerpo murino 40-12 se superpone a la del modelo resultante de las secuencias germinales que muestran la similitud más considerable optimizando las posiciones de los carbonos alfa de los aminoácidos. Los

721

aminoácidos identificados como flexibles mutan por los aminoácidos correspondientes en la secuencia del modelo que muestra la similitud más considerable.

Los motivos de las secuencias no deseables considerados son los siguientes: Aspartato-Prolina (unión peptídica lábil en medio ácido), Asparagina-X-Serina/Treonina (sitio de glicosilación, X=todo aminoácido salvo la Prolina), Aspartato-Glicina/Serina/Treonina (formación potencial de succinimida/iso-aspartato en las zonas flexibles), Asparagina-Glicina/Histidina/Serina/Alanina/Cisteína (sitios expuestos de desamidación), Metionina (oxidación en las zonas expuestas). Las secuencias humanizadas así obtenidas se comparan finalmente mediante el algoritmo BLAST de comparación de secuencia, con las secuencias de la base de IEDB dadas (<http://www.immuneepitope.org/> La base de datos inmune epítipo y análisis de los recursos: de la visión a blueprint. PLoS Biol. 2005 Mar; 3 (3):e91) para asegurar que las secuencias no contienen epítopos conocidos para ser reconocidos por las células linfocitos B y T. Si la secuencia contiene restos que presentan secuencias indeseables, también se modifican entonces. Si la secuencia del compuesto contiene un epítipo conocido catalogado en el IEDB, entonces se utiliza como modelo otra estructura de referencia germinal que muestre una gran similitud.

De manera más ventajosa, el anticuerpo según la invención comprende las secuencias que presentan al menos 80%, 90%, 95% o 99% de identidad utilizándose la secuencia SEC ID N° 30 o la secuencia SEC ID N° 32, en combinación con las secuencias que presentan al menos al menos 80%, 90%, 95% o 99% de identidad con la secuencia SEC ID N° 34, la secuencia SEC ID N° 36 o la secuencia SEC ID N° 38.

En un modo de realización, el anticuerpo según la invención comprende las cadenas variables ligeras de secuencia SEC ID N° 30 y las cadenas variables pesadas de secuencia SEC ID N° 34.

En otro modo de realización, el anticuerpo comprende cadenas variables ligeras de secuencia SEC ID N° 32 y cadenas variables pesadas de secuencia SEC ID N° 38.

En otro modo de realización, el anticuerpo comprende cadenas variables ligeras de secuencia SEC ID N° 30 y cadenas variables pesadas de secuencia SEC ID N° 36.

En otro modo de realización, el anticuerpo comprende cadenas variables ligeras de secuencia SEC ID N° 32 y cadenas variables pesadas de secuencia SEC ID N° 34.

En otro modo de realización el anticuerpo comprende cadenas variables ligeras

de secuencias SEC ID N° 32 y cadenas variables pesadas de secuencia SEC ID N° 36.

En otro modo de realización el anticuerpo comprende cadenas variables ligeras de secuencia SEC ID N° 30 y cadenas variables pesadas de secuencia SEC ID N° 38.

- 5 La presente invención tiene igualmente por objeto anticuerpos humanos antagonistas específicos del FGF-R4. Tales anticuerpos se pueden obtener por visualización de fagos según los métodos conocidos por el experto en la materia (McCafferty J. et al, 1.990; Hoogenboom, HR et al, 2.005). Están disponibles otras tecnologías para la preparación de anticuerpos humanos tales como la tecnología
- 10 XenoMouse descrita en la patente de EE.UU. 5.939.598.

En un modo de realización particular, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 es un anticuerpo humano cuyas partes variables de la cadena pesada comprenden una secuencia que presenta al menos 80%, 90%, 95% o 99% de identidad con la secuencia SEC ID N°: 76, 86, 96 ó 106.

- 15 En otro modo de realización, el anticuerpo antagonista específico del receptor FGF-R4 es un anticuerpo humano cuyas partes variables de la cadena ligera comprenden una secuencia que presenta al menos 80%, 90%, 95% o 99% de identidad con la secuencia SEC ID N°: 71, 81, 91 ó 101.

- La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena pesada que comprende una parte variable codificada por una secuencia nucleotídica que presenta una identidad de al menos 80%, 90%, 95% o 99% con la secuencia SEC ID N° 77, 87, 97 ó 107.
- 20

- La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende una cadena ligera que comprende una parte variable codificada por una secuencia nucleotídica que presenta una identidad de al menos 80%, 90%, 95% o 99% con la secuencia SEC ID N° 72, 82, 92 ó 102.
- 25

- La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende las secuencias codificadas por las secuencias nucleotídicas SEC ID N°: 71 y 76 o las secuencias nucleotídicas SEC ID N°: 81 y 86 o las secuencias nucleotídicas SEC ID N°: 91 y 96 o las secuencias nucleotídicas SEC ID N°: 101 y 106.
- 30

- La presente invención tiene igualmente por objeto un anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4 que comprende las secuencias
- 35

polipeptídicas SEC ID N°: 72 y 77 o las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 82 y 87 o las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 92 y 97 o las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 102 y 107.

De manera particularmente preferida, un anticuerpo humano antagonista específico del receptor FGF-R4 comprendiendo las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 82 y 87.

Las secuencias en aminoácidos así modificadas se pueden modificar también por modificaciones post-traduccionales durante la producción en la célula de mamífero. En particular, el empleo de líneas estables deficientes en la biosíntesis de fucosa puede permitir producir anticuerpos monoclonales de los cuales el N-glucano del Fc (posición N297) está desprovisto parcial o totalmente de fucosa y permite aumentar el efecto realizador ADCC ( Kanda et al., 2.006, *Biotechnol. Bioeng.* 94:680-688 y Ripka et al., 1.986 *Arch Biochem Bioph* 249: 533-545).

En otro modo de realización de la invención, el antagonista específico de FGF-R4 es un anticuerpo conjugado.

Los anticuerpos pueden estar conjugados con un agente citotóxico. La terminología «agente citotóxico» designa en la presente memoria una sustancia que reduce o bloquea la función o el crecimiento de las células o causa la destrucción de las células.

En un modo de realización, el anticuerpo o un fragmento de unión de éste puede estar conjugado con un medicamento, tal como un maitansinoide, para formar un «pro-medicamento» con una citotoxicidad para con las células que expresan el antígeno.

El agente citotóxico de la presente invención puede ser cualquier compuesto que resulte de la muerte de una célula o induzca la muerte de una célula o disminuya de diversas maneras la viabilidad de las células. Los agentes citotóxicos preferidos incluyen, por ejemplo, los maitansinoides y análogos de maitansinoides, taxoides, CC-1065 y análogos de CC-1065, dolastatina y análogo de dolastatina, definidos anteriormente. Estos agentes citotóxicos están conjugados con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus análogos, como se describe en la presente solicitud.

Los anticuerpos conjugados se pueden preparar por métodos *in vitro*. Con el fin de unir un medicamento o un pro-medicamento al anticuerpo se utiliza un grupo de enlace. Los grupos de enlace apropiados son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen especialmente grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido lábiles,

grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles y grupos estearasa lábiles. Los grupos de enlace preferidos son los grupos disulfuro y los grupos tioéter. Por ejemplo, se puede construir un conjugado utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un puente tioéter entre el anticuerpo y el medicamento o pro-medicamento.

- 5 Los compuestos tales como: metotraxetato, daunorubicina, vincristina, vinblastina, melfalano, mitomicina C, clorambucilo, calichamicina, tubulisina y análogos de la tubulisina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolastatina y los análogos de la dolastatina son igualmente apropiados para la preparación de conjugados de la presente invención. Las moléculas pueden unirse también a las moléculas de
- 10 anticuerpo por una molécula intermedia tal como la sueroalbúmina. La doxorubicina y los compuestos de doxorubicina, como se describe por ejemplo en la solicitud de patente de EE.UU. 09/740991, también pueden ser agente citotóxicos útiles.

- Los anticuerpos objeto de la presente invención pueden estar asociados a una molécula o un compuesto citotóxico. También pueden estar asociados a un compuesto
- 15 anti-angiogénico que sea eficaz en otras vías de la angiogénesis.

- Por «células que expresan el FGF-R4», se entiende cualquier célula eucariota, especialmente de mamíferos y en particular humana, que exprese un receptor FGF-R4 en su forma nativa, bajo una forma mutada. El FGF-R4 puede estar igualmente en su forma entera o en una forma troncada que comprenda por ejemplo el dominio
- 20 extracelular de FGR-R4 y en particular los dominios D2-D3. El FGF-R4 puede estar igualmente recombinado en una forma quimérica.

- Los compuestos de la invención se pueden formular en las composiciones farmacéuticas con vistas a una administración por vía tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular etc. Preferiblemente, las
- 25 composiciones farmacéuticas contienen vehículos farmacéuticamente aceptables para una formulación inyectable. Se puede tratar en particular de disoluciones salinas (fosfato monosódico, disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, etc., o mezclas de dichas sales), estériles, isotónicas o de composiciones secas, especialmente liofilizadas, que además según el caso de agua esterilizada o de suero
- 30 fisiológico, permitan la constitución de solutos inyectables.

Las patologías concernientes pueden ser todas las enfermedades unidas a la angiogénesis, tumoral o no tumoral.

Las patologías concernientes pueden ser el cáncer (con la utilización de la invención como inhibidor de la angiogénesis tumoral), especialmente cáncer de

hígado, colon, mama o de pulmón, próstata, páncreas o de la piel o incluso patologías para las que se describe una desregulación de la angiogénesis como: la degeneración macular relacionada con la edad o DMLA, enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, osteoartritis, colitis, úlceras o cualquier enfermedad inflamatoria de los intestinos, aterosclerosis o incluso en el tratamiento de la obesidad

Los anticuerpos anti-FGF-R4 se pueden utilizar igualmente para tratar el cáncer, especialmente los hepatocarcinomas y otros tumores malignos hepáticos y el cáncer de páncreas como inhibidor que tiene una acción directamente sobre el crecimiento tumoral.

La presente invención se ilustra, sin estar limitada sin embargo, por los ejemplos que siguen.

#### **Descripción de las figuras**

**Figuras 1A y 1B:** *In vitro* (Fig 1A) las células endoteliales humanas de tipo HUVEC son capaces de formar una red de pseudotúbulos denominada angiogénesis. Esta red está estimulada por la adición de 1 ng/ml de FGF2. Esta inducción se puede obtener igualmente por la adición de 10 ng/ml de FGF19, ligando específico de FGF-R4 aunque 10 ng/ml de FGF4 (ligando no activador de FGF-R4) no pueden estimular la angiogénesis. De la misma manera, *in vivo*, (Fig 1B) en un modelo murino de inducción de la angiogénesis al nivel de implante de esponja en el lomo del ratón, el FGF2 es capaz de inducir el reclutamiento de neovasos funcionales hacia la esponja que se caracteriza por un aumento del contenido de hemoglobina de estas esponjas en comparación con el control. El FGF19 es capaz igualmente de inducir esta angiogénesis al nivel de la esponja.

**Figura 2A :** Representación del plásmido pXL4614 que permite la expresión de hFGFR4-Histag. (SEC ID N° 40)

**Figura 2B:** Representación del plásmido pXL4613 que permite la expresión de hFGFR4-Streptag. (SEC ID N° 69).

**Figura 3:** Representación del plásmido pXL4615 que permite la expresión de hFGFR4(D2,D3)-Histag. (SEC ID N° 42)

**Figura 4:** Representación del plásmido pXL4621 que permite la expresión de mFGFR4-Histag. (SEC ID N° 44)

**Figura 5:** Representación del plásmido pXL4328 que permite la expresión de hFGFR1-Fc (de secuencia SEC ID N° 46)

**Figura 6:** Representación del plásmido pXL4327 que permite la expresión de hFGFR2-Fc (de secuencia SEC ID N° 48)

**Figura 7:** Las placas ELISA se recubren por los 4 receptores humanos de los FGF. La capacidad de los anticuerpos anti-FGFR4 40-12 y 64-12 para reconocer estos diferentes FGF-R se mide por análisis ELISA. El clon 40-12 (histograma negro) es específico de FGF-R4. El clon 64-12 (histograma gris) reconoce además el FGF-R3 muy débilmente.

**Figuras 8A y 8B:** El anticuerpo antagonista activo 40-12 y su control inactivo 64-12 no tienen efecto propio sobre la angiogénesis basal. Por el contrario, a la dosis de 30 µg/ml (aproximadamente 200 nM), el anticuerpo monoclonal anti-FGFR4 40-12 puede inhibir la angiogénesis de células HUVEC inducida por el FGF2 aunque el anticuerpo de control 64-12 no sea capaz (Fig 8A).

El FGF2 marcado con ayuda de un AlexaFluor®, 488 nm, es capaz de unirse al FGF-R4 expresado por las células 300-19 (histograma blanco). Esta interacción se puede disociar por el FGF2 no marcado (histogramas negros) o por el anticuerpo anti-FGFR4 40-12 (histogramas gris oscuro) aunque el anticuerpo de muestra 64-12 no es capaz (histogramas gris claro) (Fig 8B).

**Figura 8C y 8D:** Efecto de los anticuerpos anti-FGFR4 resultantes de los clones 8, 31, 33 y 36 a 10 µg/ml sobre la angiogénesis *in vitro* inducida por 3 ng/ml de FGF-2. Los clones 8 (Fig 8C) y 31, 33 y 36 (Fig 8D) inhiben la angiogénesis de las células HUVEC inducida por el FGF-2.

**Figuras 9A y 9B:** Las células de los hepatocarcinomas humanos Hep3b son estimuladas por el FGF19 a 30 ng/ml. Esta estimulación induce una señalización celular específica de FGF-R4 que conduce a la síntesis de las proteínas cFos y JunB y a la fosforilación de Erk1/2 observada por el método Western (Fig 9A). Cada banda se cuantifica después. Esta cuantificación se representa en forma de histograma (Fig 9B). El anticuerpo 40-12 a 100 µg/ml inhibe totalmente la inducción de la señalización celular específica de FGF-R4 aunque el anticuerpo de control no tiene ningún efecto. En efecto, el anticuerpo 40-12 bloquea completamente la síntesis de JunB y de cFos así como la fosforilación de Erk1/2 inducida por el FGF19 después de una simulación de 3 h.

**Figura 9C:** El efecto inhibitor del anticuerpo anti-FGFR4 40-12 sobre la fosforilación de Erk1/2 inducida en las células Hep3b por el FGF-19 (30 ng/ml) se confirma con ayuda del ELISA anti-fosfoERK1/2. El anticuerpo 40-12 es capaz también de inhibir la fosforilación de Erk1/2 en las células Hep3b estimuladas por el FGF-2 (1 ng/ml) o por suero (SVF) al 10%.

**Figura 9D:** Porcentaje de inhibición de la fosforilación de Erk1/2 inducida por el

FGF-19 (30 ng/ml) obtenido por ELISA en células Hep3b con ayuda de los anticuerpos resultantes de los clones 8, 31, 33 y 36.

**Figuras 10A y 10B:** La proliferación de células Hep3b puede ser estimulada por la adición de suero (Fig 10A) o de FGF19 (Fig 10B). La inducción por el suero está  
5 parcialmente inhibida por el anticuerpo 40-12 a 100 µg/ml aunque no tenga efecto el anticuerpo de control (Fig 10A). La proliferación inducida por el FGF19 está totalmente bloqueada por 10 µg/ml de anticuerpo anti-FGFR4 40-12 aunque a esta misma dosis, el anticuerpo de control no tiene capacidad (Fig 10B).

**Figuras 11A a 11D:** El anticuerpo anti-FGFR4 40-12 es capaz de reducir el  
10 desarrollo de tumores pancreáticos en un modelo murino RipTag inhibiendo la angiogénesis tumoral: El modelo Rip1-Tag2 es un modelo murino en que los ratones transgénicos expresan el antígeno T del SV40 en las células β de los islotes pancreáticos que producen la insulina (Hanahan D. Nature, 1.985, 9-15:115-22.). Este antígeno T se expresa durante el desarrollo embrionario del páncreas hasta 4 a 5  
15 semanas de vida, sin efecto aparente. Una parte de los islotes pancreáticos que expresan el antígeno T progresa entonces durante las 5 semanas siguientes hacia la formación de islotes angiogénicos asociados a una activación de la vasculatura después hacia el desarrollo de pequeños tumores de tipo adenoma. Algunas semanas más tarde se desarrollaron algunos adenomas para formar carcinomas invasivos  
20 (Fig.11A).

Estos ratones Rip1-Tag2 son tratados por vía subcutánea una vez por semana entre las semanas 10 y 13 a la dosis de 25 mg/kg con ayuda del anticuerpo 40-12 o del anticuerpo de control. Después de 13 semanas, se sacrifican los ratones. Se determina el volumen tumoral así como el número de tumores por páncreas y la  
25 densidad vascular. El tratamiento por el anticuerpo anti-FGFR4 40-12 permite reducir significativamente el volumen tumoral del 55% aunque el anticuerpo de muestra no presente ningún efecto (Fig. 11B). El anticuerpo 40-12 permite igualmente reducir al 34% el número de tumores por páncreas en comparación con la muestra (Fig. 11C). Esta reducción del volumen tumoral está acompañada por una reducción de la  
30 densidad vascular, sea al nivel del número de vasos pequeños, medios o grandes (Fig. 11D).

**Figura 12:** La capacidad de los anticuerpos 40-12 y 64-12 para reconocer el dominio extracelular completo del FGF-R4 humano o murino así como el dominio extracelular del FGF-R4 amputado de su dominio D1, se mide por ELISA. El clon 40-  
35 12 es capaz de unirse bien también con las 3 construcciones de FGF-R4 aunque el

clon 64-12 reconoce menos bien la forma murina del FGF-R4.

**Figura 13A a 13C:** El efecto antagonista del anticuerpo anti-FGFR4 clon 40-12 en la unión FGF2/FGF-R4 se mide por experiencias de competición de unión con el FGF2 marcado con ayuda de un AlexaFluor®, 488 nm. El clon 40-12 es capaz de  
5 bloquear la unión del FGF2 humano (Fig. 13A) , murino (Fig. 13B) y de rata (Fig. 13C) en las células 300-19 murinas transfectadas con ayuda del ADNc que codifica las formas humanas, murinas o de rata del receptor FGF-R4, y ésto, con la misma eficacia (3.500, 4.110 y 3.940 ng/ml o 23, 27 y 26 nM para los complejos humanos, murinos o de rata, respectivamente).

10 **Figura 14A :** Representación del plásmido pXL4794 que permite la expresión de hFGFR4\_D1 : Fc

**Figura 14B :** Secuencia de aminoácidos de la proteína hFGFR4\_D1 : Fc segregada en la línea HEK293 transfectada con el plásmido pXL4794

**Figura 15A :** Representación del plásmido pXL4796 que permite la expresión  
15 de hFGFR4\_D2 : Fc

**Figura 15B :** Secuencia de aminoácidos de la proteína hFGFR4\_D2 : Fc segregada en la línea HEK293 transfectada con el plásmido pXL4796

**Figura 16A :** Representación del plásmido pXL4799 que permite la expresión de hFGFR4\_D3 : Fc.

20 **Figura 16B :** Secuencia de aminoácidos de la proteína hFGFR4\_D3 : Fc segregada en la línea HEK293 transfectada con el plásmido pXL4799

### **EJEMPLOS:**

**Ejemplo 1: Puesta en evidencia del papel de FGF-R4 en el control de la angiogénesis**

25 Para demostrar el papel de FGF-R4 en el control de la angiogénesis, se han realizado experiencias de angiogénesis *in vitro* con células endoteliales humanas de tipo HUVEC estimuladas con diversos FGF. El FGF2, ligando activador de la mayor parte de los receptores de los FGF. El FGF19, ligando activador específico de FGF-R4 y el FGF4 ligando no activador de FGF-R4.

30 Para hacerlo, se han preparado geles que se distribuyen en cada pozo del chamberslide (Cellware Biocoat, colágeno, tipo I, hojas de cultivo de 8-pozos: Becton dickinson 354630), 160 µl de matrigel diluido a 1/6 (Matrigel de factor de crecimiento reducido: Becton dickinson 356230) en colágeno (colágeno de cola de rata, tipo I : Becton dickinson 354236). Se mantienen los geles durante 1 hora, a 37°C, para  
35 permitir su polimerización. A continuación, se sembraron células endoteliales venosas

humanas (HUVEC ref : C-12200 – Promocell) a  $15 \cdot 10^3$  células/pozo, en 400 µl de medio EBM (Clonetics C3121) + FBS al 2 % + hEGF 10 µg/ml. Este protocolo se puede adaptar a placas de 96 pozos: 60 µl por pozo de placas de 96 pozos (colágeno/cellware Biocoat, Becton Dickinson 354407). La matriz se prepara mezclando 1/3 de matrigel, 1 mg/ml final de colágeno, NaOH (0,026x el volumen de colágeno en µl), PBS 1x, el volumen se ajustó a continuación con agua. Las células endoteliales se estimularon con 1 ng/ml de FGF2 (R&D, 133-FB-025) o 10 ng/ml de FGF4 (R&D, 235-F4-025) o de FGF19 (R&D, 969-FG-025) durante 24 h, a 37°C, en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas, se midió la longitud de la red de microtúbulos formados con ayuda de un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador (Imagenia Biocom, Courtaboeuf, Francia) y se determinó la longitud total de los pseudotúbulos en cada pozo. La media de la longitud total del depósito del microcapilar se calculó en µm para cada condición correspondiente a la media sobre 6 replicados.

La estimulación por el FGF2 o el FGF19 permitió la inducción de la formación de nuevos túbulos aunque el FGF4 no tuviera efecto (Fig. 1A). Estos resultados demuestran que la activación específica de FGF-R4 permite inducir la formación de neo-vasos y concluir pues que FGF-R4 controla la angiogénesis *in vitro*.

La correlación *in vivo* con las dadas *in vitro* se ha obtenido con ayuda del modelo de inducción de la angiogénesis *in vivo* en implantes de celulosa en el ratón. Este modelo es una adaptación del modelo descrito por Andrade et al. (*Microvascular Research*, 1.997, 54, 253-61).

Los animales, ratones blancos BALB/c J consanguíneos, se anestesian con una mezcla de Xilazina (Rompun®, 10 mg/kg)/ Ketamina (Imalgène 1.000, 100 mg/kg) por vía intraperitoneal. Se afeita el lomo del animal y se desinfecta con Hexomedine®. Se crea una bolsa de aire subcutánea en el lomo del ratón por inyección de 5 ml de aire estéril. Se realiza una incisión de aproximadamente 2 cm, en lo alto del lomo del animal para introducir un implante de celulosa estéril (disco de 1 cm de diámetro, espesor de 2 mm, Cellspon® ref 0501) impregnado con 50 µl de disolución estéril que contiene la proteína o el producto que se tiene que ensayar. Después se sutura la incisión y se limpia con Hexomedine®. Los días siguientes a la colocación del implante, los ratones recibieron en el implante la proteína o el producto por una inyección a través de la piel (50 µl/implante/día) bajo anestesia gaseosa (Isoflurano al 5 % (Aerrane®, Baxter).

Siete días después de la colocación de la esponja, se sacrifican los ratones mediante una dosis letal de Pentobarbital sódico (CEVA salud animal), administrada

por vía intraperitoneal. Se recorta la piel a continuación, aproximadamente 1 cm alrededor de la esponja evitando la cicatriz para sacar la piel y la esponja. Se recorta la esponja a continuación en varios trozos y se pone en un tubo Ribolyser® que contiene 1 ml de tampón de lisis (Detección de Muerte Celular ELISA, Roche). Se agitan los tubos 4 veces consecutivas, durante 20 s, fuerza 4, en un molino celular (FastPrep® FP 120). Se centrifugan los tubos a continuación 10 min a 2.000 g a 20°C y se congelan los sobrenadantes a -20°C, esperando la dosificación de Hemoglobina.

El día de la dosificación, se centrifugan los tubos de nuevo después de descongelación y se mide la concentración de hemoglobina con el reactivo de Drabkin (Sigma, volumen a volumen) por lectura en un espectrofotómetro, a 405 nm, contra una gama de patrones de hemoglobina bovina (Sigma). La concentración de hemoglobina en cada muestra se expresa en mg/ml después de la regresión polinomial realizada a partir de la gama. Los resultados se expresan en valor medio ( $\pm$ sem) para cada grupo. Las diferencias entre los grupos se ensayan con una ANOVA seguido por un ensayo de Dunnett sobre la raíz cuadrada de los valores.

En este modelo, el FGF19 a 50 ng por sitio y 5 re-inyecciones es capaz de inducir significativamente la colonización de la esponja por vasos maduros nuevamente formados con la misma eficacia que el FGF2 a 5 ng por sitio. La presencia de vasos sanguíneos funcionales en la esponja se pone en evidencia por la presencia de hemoglobina (Fig. 1B). Estos resultados demuestran que la activación específica de FGF-R4 permite el reclutamiento de vasos sanguíneos funcionales, que indica que FGF-R4 controla igualmente la angiogénesis *in vivo*.

#### **Ejemplo 2 : Descripción de las proteínas FGFR utilizadas como inmunógeno y antígeno.**

Los receptores de los factores de crecimiento FGFR y en particular los dominios extracelulares de FGF-R1, FGF-R2, FGF-R3, FGF-R4 se fusionan a un tag (Histag) o al dominio Fc de inmunoglobulina.

El ADNc que codifica el dominio extracelular de FGF-R4 humano, corresponde a la proteína descrita en SwissProt FGF-R4\_HUMAN, posición 1-365, con la mutación L136P. Se ha clonado en el vector de expresión eucariota pXL4614 representado en la figura 2 para expresar una proteína que contenga un Histag en posición C-terminal en el dominio extracelular.

Las proteínas denominadas hFGFR4-Histag, de secuencia SEC ID N° 40 se han producido por transfección transitoria en la línea HEK293 EBNA (Invitrogen) con ayuda del plásmido pXL4614 y los plásmidos accesorios pXL4544 y pXL4551 que

permiten la expresión de dos enzimas de glucosilación de los N-glucanos, es decir, la  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa y la  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa como se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 2008/065543.

La proteína hFGFR4-Histag expresada en el sobrenadante de cultivo de células  
5 HEK293 EBNA se ha purificado por cromatografía sobre columna de sepharosa Ni-  
quelante (Amersham Biosciences; ref. 17-0575-01) y elución en tampón de imidazol,  
después formulada en tampón PBS (Invitrogen; ref. 14190-094). El análisis de la  
composición en monosacáridos y la cuantificación de ácidos siálicos de los N-glucanos  
10 como se describe por Saddic et al. 2.002. (Methods Mol. Biol. 194:23-36 y Anumula et  
al. 1.998. Glycobiology 8:685-694) han permitido demostrar que la proteína era sialilada  
muy ampliamente (91%). Como consecuencia, la proteína tenía todas las  
características para tener las suficientes propiedades farmacocinéticas.

De manera comparable, la proteína hFGFR4-Streptag (SEC ID N° 69) se ha  
purificado por cromatografía sobre columna Strep-Tactin Superflow (IBA; ref. 2-1206) y  
15 elución en tampón de destiobiotina, después formulada en tampón PBS.

La proteína hFGFR4(D2,D3)-Histag corresponde a la secuencia SEC ID N° 42.  
Se ha clonado el ADNc en el plásmido de expresión eucariota pXL4615 representado  
en la figura 3 y se ha producido y se ha purificado la proteína en condiciones  
comparables a las de la proteína hFGFR4-Histag.

20 El ADNc que codifica la proteína mFGFR4-Histag (SEC ID N° 43) se ha  
clonado en el plásmido de expresión eucariota pXL4621 representado en la figura 4 y  
se ha producido y se ha purificado la proteína en condiciones comparables a las de la  
proteína hFGFR4-Histag.

La proteína hFGFR1-Fc, (SEC ID N° 46) contiene el dominio extracelular de  
25 FGF-R1 IIIc humano fusionado en C-terminal al dominio Fc del IgG1 humano. El ADNc  
se ha clonado en el plásmido de expresión eucariota pXL4728 representado en la  
figura 5 y se ha producido la proteína en condiciones comparables a las de la proteína  
hFGFR4-Histag, después purificada por cromatografía sobre columna de afinidad de  
Sephara proteína G (Amersham Biosciences) y elución en tampón 100 mM de  
30 glicina/HCl, pH 2,7, después formulada en tampón PBS.

La proteína hFGFR2-Fc, de secuencia SEC ID N° 48, contiene el dominio  
extracelular de FGF-R2 IIIc humano, fusionado en C-terminal al dominio Fc del IgG1  
humano. Se ha clonado el ADNc en el plásmido de expresión eucariota pXL4327  
representada en la figura 6 y se ha producido la proteína, después se ha purificado, en  
35 condiciones comparables a las de la proteína hFGFR1-Fc.

La proteína hFGFR3-Fc es una proteína que fusiona el dominio extracelular de FGF-R3 Ilc humano al dominio Fc del IgG1 humano, se ha obtenido de R&D System (ref: 760-FR).

La proteína hFGFR4-Fc es una proteína que fusiona el dominio extracelular de FGF-R4 humano al dominio Fc del IgG1 humano, se ha obtenido de R&D Systems (ref: 685-FR).

Se han fusionado diferentes sub-dominios de la parte extracelular de la proteína hFGFR4 al dominio Fc del IgG1 humano. El sub-dominio D1 está contenido en la construcción SABVA4794 (SEC ID N° 112 y Fig 14A y 14B). El sub-dominio D2 está contenido en la construcción SABVA4796 (SEC ID N° 114 t Fig 15A y 15B). El sub-dominio D3 está contenido en la construcción SABVA4799 (SEC ID N° 116 y Fig 16A y 16B). Estos tres sub-dominios se extienden respectivamente de las posiciones 1 a 179 para SABVA4794, 1 a 32 más 145 a 242 para el SABVA4796 y 1 a 32 más 228 a 360 para el SABVA4799 (posiciones descritas en SwissProt FGF-R4\_HUMAN). Estas proteínas se han producido a partir de los plásmidos pXL4794 (secuencia codificadora SEC ID N° 111), pXL4796 (secuencia codificadora SEC ID N° 113) y pXL4799 (secuencia codificadora SEC ID N° 115) en condiciones comparables a las de la proteína FGFR1-Fc .

### **Ejemplo 3 : Generación y cribado de anticuerpos monoclonales anti-FGF-R4**

#### **A – Anticuerpo obtenido por inmunización**

Los anticuerpos monoclonales se han obtenido por inmunización con el inmunógeno hFGFR4-Histag en cinco ratones BALB/cJ (Charles River), de 6 a 8 semanas de edad, inmunizados cada uno con un total de 24 µg de hFGFR4-Histag por el método RIMMS descrito por Kilpatrick et al. (1.997. Hybridoma 16: 381389) y el protocolo de fusión descrito en ClonaCell™- Estuche de Clonación de Hibridomas HY (StemCell Technologies; ref 03800).

Dos días después de la última inyección, se sacrificaron los ratones y se fusionaron los nódulos linfáticos con las células de mieloma P3X63-AG8.653 (ATCC, CRL-1580) en una relación 5:1 en presencia de Polietilenglicol (ClonaCell™-HY ref. 03806). Se repartió asépticamente la suspensión celular en cajas de Petri incubadas a 37°C, en presencia de CO<sub>2</sub> al 5 %. Se aislaron las colonias aparecidas después de 12 días de incubación y se pusieron en cultivo en medio E (ClonaCell™-HY; ref. 03805) en cajas de 96 pozos.

El cribado primario de anticuerpos monoclonales obtenidos por inmunización

con hFGFR4-Histag se realizó por análisis ELISA utilizando como antígeno de captura hFGFR4 –Streptag. Se fijó el antígeno de captura en cajas Immulon-4 unido a enzima (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Se añadieron después los sobrenadantes de cultivo de hibridomas, después detectados gracias al anticuerpo de conejo anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa (Sigma; ref. A9044-dilución al 1:50.000). El revelado se realizó con el substrato TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Interchim; ref UP664780) y las mediciones con la lectora de placas a 450 nm. Entre los 444 hibridomas ensayados, 129 fueron positivos por análisis ELISA con el antígeno hFGFR4-Streptag cuyos 120 hibridomas fueron también positivos con la proteína dímera hFGFR4-Fc.

- 5
- 10 Se realizó un cribado secundario para seleccionar únicamente los anticuerpos específicos al FGF-R4 por análisis ELISA, utilizando como antígeno de captura la proteína hFGFR4-Streptag, después con las proteínas hFGFR1-Fc, hFGFR2-Fc y hFGFR3-Fc descritas en el ejemplo 2. Se fijó el antígeno de captura en cajas Immulon-4 unido a enzima (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Se añadieron después los sobrenadantes de cultivo de hibridomas, después se detectaron gracias al anticuerpo de conejo anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa (Sigma; ref. A9044-dilución al 1:50.000). El revelado se realizó con el substrato TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Interchim; ref UP664780) y las mediciones con la lectora de placas a 450 nm.
- 15

- 20 Entre los 129 hibridomas ensayados, positivos, por análisis ELISA con el antígeno, 84 hibridomas fueron positivos con hFGFR4-Streptag y no tuvieron afinidad ni por hFGFR1-Fc, ni por hFGFR2-Fc ni por hFGFR3-Fc. En función de su crecimiento y de su morfología, se conservaron 39 hibridomas. Se determinó su isotipo con ayuda del estuche SEROTEC (ref. MMT1); 95 % fueron de IgG1.

- 25 Se realizó un cribado terciario sobre un ensayo de proliferación de células modificadas Baf/3, inducido por FGF2 para caracterizar la inhibición por los anticuerpos anti-FGFR4.

- 30 Se clonaron los hibridomas murinos que expresaban los anticuerpos anti-FGFR4 antagonistas por dilución límite. A partir de las células de hibridomas cultivadas en fase exponencial, se determinó la secuencia codificadora (ADNc) después de extracción del ARNm con ayuda del estuche Oligotex (Qiagen; ref 72022); obtención y amplificación del ADNc por el método RACE-RT con el estuche Gene Racer, la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen; ref L1500) y los cebadores (cebadores en inglés) descritos en la tabla 3 a continuación; la amplificación de fragmentos de ADNc con ayuda de la polimerasa Phusion (Finnzymes; ref. F-530S), los cebadores (cebadores) y las condiciones de temperatura descritas en la tabla 2. Se
- 35

34

clonaron los fragmentos amplificados que contenían las partes codificadoras para VH (parte variable de la cadena pesada HC) o VL (parte variable de la cadena ligera LC), en el vector pGEM-T Easy de Promega; ref A137A), se secuenciaron los insertos de los plásmidos obtenidos, de manera que se analizara la secuencia codificadora de cada dominio variable en el sentido 5'-3' y 3'-5' en al menos 6 plásmidos correspondiendo a los anticuerpos anti-FGFR4 40-12 y anti-FGFR4 64-12. Se realizaron los análisis de secuencia, contigs y alineaciones con ayuda del programa disponible sobre Vector NTI (Invitrogen).

Se conservaron los plásmidos que contenían las secuencias consensuadas que codificaban las partes variables de los anticuerpos anti-FGFR4. El plásmido pXL4691 contiene la secuencia que codifica la VH de secuencia SEC ID N° 5 del anticuerpo anti-FGFR4 40-12 y el plásmido pXL4693 contiene la secuencia que codifica la VH de secuencia SEC ID N° 19 del anticuerpo anti-FGFR4 64-12 como se presenta en la tabla 3 a continuación.

El plásmido pXL4690 contiene la secuencia nucleotídica SEC ID N° 7 que codifica la VL de secuencia SEC ID N° 8 del anticuerpo anti-FGFR4 40-12 y el plásmido pXL4692 contiene la secuencia nucleotídica SEC ID N° 21 que codifica la VL de secuencia SEC ID N° 22 del anticuerpo anti-FGFR4 64-12, como se presenta en la tabla 3 a continuación.

BS

Tabla 3 - Condiciones de operación y análisis de reacciones de la transcriptasa inversa y PCR- Identificación de los plásmidos pXL4690 a pXL4693.

| Anti-FGFR4                                                       | 40-12                                                                             | 64-12                                                                            |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Temperatura de la Reacción TR<br>Cebadores                       | 55°C<br>SEC ID N° 64 (HC)<br>SEC ID N° 65 (LC)                                    | 55°C<br>SEC ID N° 64 (HC)<br>SEC ID N° 66 y SEC ID N° 67 (LC)                    |
| Cebador 5'-GeneRacer (SEC ID N° 63)                              | 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'                                                     |                                                                                  |
| Cebador 3'- interno a la articulación murina (SEC ID N° 64)      | 5'-TATGCAAGGCTTACAACCACA-3'                                                       |                                                                                  |
| Cebador 3'- interno al Ck murino (SEC ID N° 65)                  | 5'-CTCATTCCTGTT<br>GAAGCTCTT GAC-3'                                               |                                                                                  |
| Cebadores 3'- internos a Cλ murino (SEC ID N° 66 y SEC ID N° 67) |                                                                                   | 5'- ACACTCAGCACGGG<br>ACAAACTCTTCTC-3'<br>5'- ACACTCTGCAGGAG<br>ACAGACTCTTTTC-3' |
| PCR de HC:<br>Temperatura<br>Cebadores                           | 55°C<br>SEC ID N° 63 - SEC ID N° 64                                               | 55°C<br>SEC ID N° 63 – SEC ID N° 64                                              |
| Secuencia de productos PCR clonados (VH)                         | 9 clones tienen la misma secuencia VH y una secuencia CH1 idéntica a la del mCH1- | 6 clones tienen la misma secuencia VH y una secuencia CH1 idéntica a la del mCH1 |
| Plásmido que contiene VH                                         | pXL4691                                                                           | pXL4693                                                                          |
| PCR de LC :<br>Temperatura<br>Cebadores                          | 55°C<br>SEC ID N° 63 – SEC ID N° 65                                               | 55°C<br>SEC ID N° 63 – SEC ID N° 66 y 67                                         |
| Secuencia de los productos PCR clonados (VL)                     | 11 clones tienen la misma secuencia VL y una secuencia Ck idéntica a mCk          | 6 clones tienen la misma secuencia VL y una secuencia Cλ idéntica a mCλ          |
| Plásmido que contiene VL                                         | pXL4690                                                                           | pXL4692                                                                          |

Las secuencias de aminoácidos de las partes variables ligeras y pesadas, respectivamente, de los anticuerpos anti-FGFR4 64-12 y anti-FGFR4 40-12 son diferentes. Los números de las secuencias utilizadas, obtenidas y deducidas, se indican en la tabla 7.

5 Los anticuerpos 40-12 y 64-12 se han producido en frascos T500. El sobrenadante de cultivo se recogió después de 7 días. Los anticuerpos anti-FGFR4 se purificaron por afinidad sobre proteína G, después se dializó contra PBS, se filtró estéril y se conservó a 4°C.

10 Los anticuerpos antagonistas purificados tienen un  $K_D$  de  $6,5 \times 10^{-9}$  M (anti-FGFR4 40-12) y  $5,75 \times 10^{-8}$  M (anti-FGFR4 64-12).

#### B – Anticuerpo seleccionado con ayuda del método de visualización de fagos

El cribado primario de anticuerpos monoclonales obtenidos por visualización de fagos con hFGFR4-Histag se realizó por análisis ELISA utilizando como antígeno de captura hFGFR4 –Histag. Se fijó el antígeno de captura en cajas Immulon-2 unido a  
15 enzima (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Se añadieron a continuación los sobrenadantes de cultivo de E. coli infectadas por los fagos, después se detectaron gracias al anticuerpo de ratón antiM13 conjugado con la peroxidasa (GE Healthcare ; ref. 27-9421-01, dilución al 1:5.000). El revelado se realizó con el substrato TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Interchim; ref UP664780) y las mediciones de densidad óptica (D.O.) se efectuaron a  
20 450 nm.

Se realizó un cribado secundario para seleccionar únicamente los anticuerpos específicos al FGF-R4 por análisis ELISA utilizando como antígeno de captura la proteína hFGFR4-Histag, después con las proteínas hFGFR1-Fc, hFGFR2-Fc y hFGFR3-Fc descritas en el ejemplo 2. Se fijó el antígeno de captura en cajas Immulon-  
25 2 unido a enzima (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Se añadieron a continuación los sobrenadantes de cultivo de E. coli infectadas por los fagos, después se detectaron gracias al anticuerpo de ratón antiM13 conjugado con peroxidasa (GE Healthcare ; ref. 27-9421-01, dilución al 1:5.000). El revelado se realizó con el substrato TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Interchim; ref UP664780) y las mediciones de densidad óptica (D.O.) se efectuaron a  
30 450 nm.

Se secuenciaron los clones específicos al FGF-R4 seleccionados y se reclonaron en un vector de expresión para transfección transitoria de células HEK293.

Para ello, en una primera etapa, las regiones codificadoras del Fab, es decir la cadena ligera del anticuerpo, un sitio de unión de ribosoma bacteriano y la región  
35 variable de la cadena pesada del anticuerpo, se extraen del fagémido por restricción y

BS

se insertan en un plásmido de expresión de IgG para células de mamíferos, más abajo de una secuencia señal de anticuerpo eucariota y más arriba de la región constante de una cadena pesada de IgG1 humano. En una segunda etapa, la región que contiene el sitio de unión del ribosoma bacteriano y el péptido señal bacteriana de la cadena pesada se cambia contra una secuencia IRES y una secuencia señal eucariota. Los IgG se expresan por transfección transitoria de células HEK293. Este proceso se describe con detalle en *T. Jostock et al. , Journal of Immunological Methods* 289 (2.004) 65-80

Un ejemplo de secuencia de región constante de IgG1 humano que se puede utilizar en la presente invención es la secuencia SEC ID N° 117.

Se realizó un cribado terciario en un ensayo de proliferación de células modificadas Baf/3, inducido por FGF2 y descrito en el ejemplo 4 para caracterizar la inhibición por los anticuerpos anti-FGFR4 utilizando los sobrenadantes de cultivos de células HEK293 transfectadas transitoriamente por los vectores de expresión de los anticuerpos. Este cribado ha permitido identificar los anticuerpos de los clones 8, 31, 33 y 36. Las secuencias correspondientes se describen en la tabla 7.

#### **Ejemplo 4 : Establecimiento de la línea clonal murina BaF/3 FGF-R4-hMpl y protocolo de proliferación celular**

Se clonó la parte extracelular y transmembrana del FGF-R4 en fusión traduccional con el dominio intracelular del hMpl en un vector pEF6/V5-His A mutado para obtener la presencia en 5' del tag HA delante del receptor quimérico FGF-R4-hMpl.

##### Construcción del pEF6A mutado

Se mejoró el vector pEF6/V5-His A (Invitrogen, referencia V961-20) para integrar el MCS (Sitios multi Clonación, por sus siglas en inglés) asociado al tag HA situado bajo el péptido señal de IgGk del pVisualización (Invitrogen, referencia V660-20). Para hacerlo, se amplificó el MCS asociado al tag HA y a su péptido señal por PCR entre los cebadores sentido de secuencia SEC ID N°: 51 e inversa de secuencia SEC ID N°: 52 permitiendo insertar los sitios de restricción KpnI en 5' y XbaI en 3'. Se digirió el fragmento PCR por las enzimas KpnI y XbaI, después se clonó en el vector pEF6/V5-His A abierto por las mismas enzimas. Por último, el primer sitio BamHI del MCS se reemplazó por el sitio BsrGI digiriéndose el vector nuevamente formado por las enzimas KpnI y SpeI e insertándose entre estos sitios los cebadores de las secuencias SEC ID N°: 53 y SEC ID N°: 54 hibridadas entre sí y conteniendo el sitio enzimático BsrGI. El vector obtenido se denominó: pEF6mut-HA.

### Construcción del vector pEF6mut-HA-FGF-R4-hMpl

El dominio intracelular del Mpl se amplificó en un vector pEF6/V5-His TOPO (Invitrogen, referencia K9610-20) entre los cebadores sentido de secuencia SEC ID N°: 55 permitiendo la inserción del sitio de digestión SacI e inversa de secuencia SEC ID N°: 56 denominada comúnmente revBGH. Se digirieron después los fragmentos PCR generados, por las enzimas SacI y NotI.

El dominio extracelular y transmembrana del FGF-R4 se amplificó con ayuda del par de cebadores (sentido: secuencia SEC ID N°: 57 ; inverso: secuencia SEC ID N°: 58). Estos cebadores permiten la inserción de sitios enzimáticos BamHI en 5' y SacI en 3'. Se digirió entonces el fragmento PCR obtenido por las enzimas BamHI y SacI.

Se clonaron entonces las amplificaciones de ADN que codificaban el hMpl y el FGF-R4, simultáneamente, en el vector pEF6mut-HA abierto BamHI – NotI. La construcción que se deduce se denominó «pEF6mut-HA FGF-R4 $\alpha$ IIIc-hMpl2». Se mejoró después esta construcción por mutagénesis dirigida para cambiar el dominio transmembrana del FGF-R4 (secuencia proteica SEC ID N°: 59) para la secuencia SEC ID N°: 60. Para hacerlo, se utilizó el estuche "QuickChange® estuche de mutagénesis sitio-dirigida" (Clontech, referencia 200518) con los cebadores sentido de secuencia SEC ID N°: 61 e inverso de secuencia SEC ID N°: 62. La nueva construcción quimérica obtenida se denominó pEF6mut-HA FGF-R4 $\alpha$ IIIcmut-hMpl2.

### Creación de una línea estable para transfección de la línea murina BaF/3 con la construcción FGF- R4 $\alpha$ IIIcmut-hMpl2:

Se introdujo la construcción «pEF6mut-HA FGF-R4 $\alpha$ IIIcmut-hMpl2» de manera estable por electroporación en el genoma de células murinas BaF/3. Se seleccionó la línea obtenida en presencia de FGF2, 20 ng/ml (R&D, referencia 234-FSE-025) y heparina, 100 ng/ml (Sigma, referencia H3149). La línea transfectada y seleccionada es entonces de tipo clonal.

### Protocolo de proliferación celular con la línea celular BaF/3 FGFR4-hMpl :

Se cultivaron y se mantuvieron las células BaF/3 FGFR4-hMpl en un medio RPMI 1640 (Invitrogen; ref. 32404-014) completo (SVF al 10 % (Hyclone; ref. SH30070.03), Glutamina 2 mM, Aminoácido No Esencial MEM 1x (Gibco, ref 11140-035), Piruvato de Sodio MEM 1x (Gibco, ref 11360-039)), enriquecido en FGF2 20 ng/ml (R&D System, ref 234-FSE) y heparina 3 ng/ml (Sigma, ref H3149)..La víspera, se sembraron las células a  $0,4 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 completo enriquecido en FGF2, 20 ng/ml y en heparina a 3 ng/ml. Al día siguiente, se

dispensaron 50  $\mu$ l de suspensión celular BaF/3 FGFR4-hMpl en medio RPMI 1640 completo enriquecido en FGF2 a 20 ng/ml y en heparina a 3 ng/ml a  $0,2 \times 10^6$  células/ml en placa de 96 pozos (Porvair, ref 214006) seguido por 50  $\mu$ l de sobrenadante de hibridoma que contenía el anticuerpo que se tenía que ensayar. A continuación se pusieron las placas a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5 %, durante 24 a 30 h. Para la lectura de la proliferación celular, se cuantificó la cantidad de ATP por adición de 100  $\mu$ l de Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, ref G7571) y se leyó la luminiscencia con ayuda de un luminómetro.

Se retuvieron los clones que presentaron en este ensayo una señal del 50% más débil que la del medio RPMI 1640 completo conteniendo los aditivos FGF2, 20 ng/ml y heparina, 3 ng/ml.

Cuando se incubaron los anticuerpos anti-FGFR4, específicos de FGF-R4, con las células Baf/3-FGFR4-hMpl y con los siguientes aditivos FGF2, 20 ng/ml y heparina, 3 ng/ml, se observó un efecto antagonista sobre la proliferación celular. Entre los 39 hibridomas ensayados, 14 pueden inhibir la proliferación celular, inducida por el FGF, de las células Baf/3-FGFR4-hMpl en presencia de FGF2.

Se demostró por ELISA (Fig 12) que los anticuerpos anti-FGFR4 antagonistas 40-12 y 64-12 eran afines a las proteínas murinas mFGFR4 y humanas hFGFR4 (D2, D3).

Por último se realizó un último cribado, por Resonancia de Plasmón de Superficie (BIAcore 2000) para determinar las constantes de afinidad de los anticuerpos anti-FGFR4. Se analizó la interacción entre la proteína FGF-R4 y el anticuerpo anti-FGFR4 presente en el sobrenadante de cultivo del hibridoma, después de haber fijado el anticuerpo anti-FGFR4 a un anticuerpo anti-Fc fijado él mismo sobre el chip CM. Las mediciones de cinéticas se realizaron según el protocolo de Canziani et al/ 2.004. Anal. Biochem. 325: 301-307.

Se seleccionaron dos anticuerpos entre éstos con constantes de afinidad de  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  M y velocidades de disociación de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  s<sup>-1</sup>. Las características de estos anticuerpos se describen en la tabla 1 a continuación.

El método de referencia utilizado para la determinación de K<sub>D</sub> es la Resonancia de Plasmón de Superficie (BIAcore).

1740

Tabla 1A:Constantes de afinidad y de asociación/disociación de los anticuerpos anti-FGFR4 antagonistas purificados 40-12 y 64-12

| Anti-FGFR4 | $k_{on} (M^{-1}.s^{-1})$ | $k_{off} (s^{-1})$ | $K_D (M)$ |
|------------|--------------------------|--------------------|-----------|
| 40-12      | 1,94E+05                 | 1,26E-03           | 6,50E-09  |
| 64-12      | 1,05E+04                 | 6,02E-04           | 5,75E-08  |

5

Tabla 1B:Parámetros cinéticos de unión de los anticuerpos anti-FGFR4 8, 31, 33 y 36 medidos por Resonancia de Plasmón de Superficie (BIAcore 3000) :

|         | sobre h-FGFR4-Histag   |                   |          | sobre h-FGFR4-Histag   |                   |          |
|---------|------------------------|-------------------|----------|------------------------|-------------------|----------|
|         | Kon ( $M^{-1}s^{-1}$ ) | Koff ( $s^{-1}$ ) | KD (M)   | Kon ( $M^{-1}s^{-1}$ ) | Koff ( $s^{-1}$ ) | KD (M)   |
| Clon 8  | 8,93E+05               | 2,92E-04          | 3,27E-10 | 1,20E+06               | 1,36E-04          | 1,15E-10 |
| Clon 31 | 6,48E+05               | 9,80E-04          | 1,52E-09 | 9,14E+05               | 1,80E-03          | 1,97E-09 |
| Clon 33 | 8,05E+05               | 6,17E-04          | 7,71E-10 | 1,01E+06               | 7,04E-04          | 6,92E-10 |
| Clon 36 | 2,44E+05               | 6,31E-04          | 2,62E-09 | 3,30E+05               | 7,52E-04          | 2,28E-09 |

10

Ejemplo 5 : Especificidad de los anticuerpos anti-FGFR4

A- Especificidad de los anticuerpos anti-FGFR4 40-12 por el FGF-R4

La especificidad de cada anticuerpo se establece por ELISA según el protocolo descrito en el ejemplo 4. De esta manera se observa la capacidad de cada anticuerpo para unirse a cada FGF-R. Esta experiencia demuestra claramente que el anticuerpo 40-12 no reconoce más que FGF-R4 y es pues específico de FGF-R4. El anticuerpo 64-12 es capaz de unirse principalmente a FGF-R4 pero igualmente débilmente a FGF-R3 (Fig.7).

15

B - Especificidad de los anticuerpos anti-FGFR4 8, 31, 33 y 36 para el FGF-R4

La especificidad de cada anticuerpo se establece por ELISA según el protocolo siguiente: las suspensiones de fagos que presentan en su superficie los anticuerpos del formato Fab se generan por infección de bacterias *E. coli*. Los antígenos de captura se han fijado en cajas Immulon-2 unidos a enzima (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). A continuación se añadieron las suspensiones de fagos, se detectaron después gracias al anticuerpo de ratón anti-fago M13 conjugado con

20

nyl

peroxidasa (GE Healthcare, ref. 27-9421-01, dilución al 1:5.000). El revelado se realizó con el sustrato TMB-H2O2 (Interchim; ref UP664780) y las mediciones de densidad óptica (D.O.) se efectuaron a 450 nm. La tabla 2 resume los resultados obtenidos:

De esta manera se observa la capacidad de cada anticuerpo para unirse a cada FGF-R. Esta experiencia demuestra claramente que los anticuerpos 8, 31, 33, 36 no reconocen más que FGF-R4 y son pues específicos de FGF-R4.

Tabla 2: Especificidad de los anticuerpos anti-FGF-R4 resultantes de los clones 8, 31, 33 y 36 establecida por ELISA (Señal = D.O., 450 nm)

|         | h-FGFR4(D2,D3)-<br>histag | h-FGFR1-Fc | h-FGFR2-Fc | h-FGFR3-Fc |
|---------|---------------------------|------------|------------|------------|
| Clon 8  | 2,55                      | 0,05       | 0,00       | 0,00       |
| Clon 31 | 2,52                      | 0,00       | 0,00       | 0,01       |
| Clon 33 | 2,73                      | 0,00       | 0,00       | -0,01      |
| Clon 36 | 1,87                      | -0,01      | -0,01      | -0,02      |

Ejemplo 6: Efecto antagonista del anticuerpo 40-12 y de los anticuerpos resultantes de los clones 8, 31, 33, 36 en la angiogénesis (in vitro)

Para determinar la actividad biológica del anticuerpo monoclonal 40-12 anti-FGFR4 durante la angiogénesis de células endoteliales humanas, las experiencias de angiogénesis in vitro se realizaron con ayuda de células HUVEC estimuladas por el FGF2 en presencia del anticuerpo 40-12 o del anticuerpo muestra en dosis crecientes de 1 a 30 µg/ml. (Fig 8A y 8B)

En este ámbito, el anticuerpo monoclonal anti-FGFR4 antagonista activo 40-12 es capaz de inhibir la angiogénesis de células HUVEC, inducida por el FGF2 y esto a la dosis de 30 µg/ml o 200 nM, aunque el anticuerpo muestra 64-12 no tiene ningún efecto. Además, el anticuerpo 40-12 no tiene ningún efecto propio sobre la angiogénesis basal.

Estos resultados indican que un anticuerpo antagonista específico de FGF-R4 es capaz de inhibir la angiogénesis.

Como para el anticuerpo 40-12, se evaluaron los anticuerpos anti-FGFR4 de los clones 8, 31, 33 y 36 resultantes de la visualización de fagos, en cuanto a su capacidad para inhibir la angiogénesis de células endoteliales humanas de tipo HUVEC, inducida por el FGF-2. Estos 4 anticuerpos bloquean la estimulación de la

angiogénesis *in vitro* obtenida con el FGF-2 y ésto a la dosis de 10 µg/ml (Fig. 8C y 8D).

**Ejemplo 7 : Efecto antagonista del anticuerpo 40-12 y de los anticuerpos resultantes de los clones 8, 31, 33, 36 sobre las células de hepatocarcinomas humanos (*in vitro*)**

Para determinar el efecto anti-tumoral del anticuerpo monoclonal anti-FGFR4 antagonista 40-12, se realizaron experiencias sobre células de hepatocarcinoma humano Hep3b en las que la proliferación y las vías de señalización y conducción dependen del par ligando-receptor: FGF19/FGF-R4.

En primer lugar, se propuso el estudio de las vías de señalización dependientes de FGF-R4 y que conducen a la proliferación de células Hep3b por el método Western. Esta señalización celular pasa por la neo-síntesis de las proteínas cFos y JunB, así como por la fosforilación de Erk1/2 (Lin et al., *J Biol Chem.*, 2.007, 14:27277-84.). Para hacer ésto, se sembraron  $5 \cdot 10^5$  células en una caja de 35 mm de diámetro, en 2 ml de medio completo (DMEM, SVF al 10%, glutamina 2 mM ). 24 h después , se pusieron en carencia las células, 24 h, en 1,8 ml de medio desprovisto de suero. A continuación se estimularon las células durante 3 h por 200 µl de FGF19 concentrado 10 veces en ausencia o en presencia de anticuerpo anti-FGFR4 de control o 40-12. A continuación se retiró el medio, se lavaron las células una vez con PBS frío y se lisaron en una caja durante 30 min, a 4°C, por 75 µl de tampón RIPA enriquecido en inhibidor de proteasa. Se centrifugó el extracto proteico total a continuación, 10 min, a 4°C, a 1.361 rad/s (13.000 rpm) y se analizó el sobrenadante por la técnica de ensayo de Western. A continuación se incubaron las membranas, 2 h, a temperatura ambiente, en TBS, tween al 0,05%, 5% de leche, después se añadió el anticuerpo primario anti-cFos (Cell Signaling Technology, ref 2250), anti-JunB (Cell Signaling Technology, ref 3746) y anti-fosfoErk1/2 (Cell Signaling Technology, ref 4377), al 1/1.000° y se incubaron una noche a 4°C con agitación lenta. Se enjuagó tres veces la membrana con TBS, tween al 0,05% y se incubó el anticuerpo secundario unido a HRP, 4 h, a 4°C, diluido al 1/2.000° en TBS, tween al 0,05%, 5% de leche. Se cuantificaron después los resultados del ensayo de Western con ayuda de un Chemigenius (Syngene). Se ponderó la intensidad de las bandas obtenidas con los diferentes anticuerpos por la intensidad de las bandas obtenidas con el anticuerpo anti-actina directamente unido con la HRP y utilizado al 1/3.000° (Santa Cruz Biotechnology, ref Sc-8432-HRP).

El FGF19 a 30 ng/ml induce la síntesis de las proteínas JunB y cFos, así como la fosforilación de Erk1/2 en las células Hep3b. Esta neo-síntesis de proteína y la

fosforilación de Erk se inhiben completamente por el anticuerpo anti-FGFR4 40-12 a 100 µg/ml, aunque el anticuerpo de control no tiene ningún efecto inhibitor. Se cuantificaron estos efectos observados en las membranas de ensayo de Western (Fig. 9A) y se representaron las intensidades de las bandas de cada membrana en forma de gráfica (Fig. 9B).

En segundo lugar, se han llevado a cabo experiencias de proliferación celular propiamente dichas. Se sembraron 5.000 células en placas de 96 pozos, en 100 µl de medio DMEM, SVF al 10%, glutamina 2 mM. 24 h después, se sometieron las células a carencia en un medio de cultivo sin suero, durante 24 h. A continuación se estimularon las células Hep3b, 72 h, por 100 µl de medio sin suero enriquecido por 10 ng/ml de FGF19 (producción interna a Sanofi-Aventis R&D) o por 10% de suero en ausencia o en presencia de anticuerpo muestra o de anticuerpo monoclonal anti-FGFR4 antagonista 40-12. Después de 3 días, se cuantificó la proliferación celular con ayuda del estuche CellTiter Glo (Promega, Francia).

De estas experiencias, se desprende que el suero así como el FGF19 son capaces de estimular la proliferación de Hep3b. El anticuerpo anti-FGFR4 antagonista 40-12 inhibe parcialmente a 100 µg/ml esta proliferación inducida al suero aunque el anticuerpo de muestra no presente actividad inhibitora (Fig. 10A). Además, el anticuerpo 40-12 a 10 µg/ml bloquea completamente la proliferación inducida por el FGF19 (Fig. 10B). El anticuerpo de muestra no tiene efecto.

Esto demuestra que se puede utilizar el anti-FGFR4 antagonista objeto de la invención, como agente terapéutico anti-tumoral en el ámbito de tumores dependientes del FGF19 o del FGF-R4 y que este anticuerpo será particularmente eficaz en el tratamiento de hepatocarcinomas.

Para simplificar el estudio del efecto de los anticuerpos anti-FGFR4 sobre las células Hep3b, se puso a punto un ensayo ELISA para la detección de la fosforilación de Erk1/2 seguido por la estimulación de estas células por el FGF-19 (en correlación con las experiencias descritas en el ejemplo 8), del FGF-2 o de suero fetal bovino.

Para hacer ésto, se sembraron 50.000 células Hep3b en placas de 96 pozos, negras, de fondo transparente (COSTAR, ref 3603) en 100 µl de medio DMEM, SVF al 10%, glutamina 2 mM. Después de 24 h, se sometieron las células a carencia durante 24 h en medio DMEM, glutamina 2 mM sin SVF. Se aspiró el medio a continuación y se reemplazó por 100 µl de medio de carencia pre-equilibrado a 37°C, conteniendo el FGF o el SVF, así como los anticuerpos evaluados a las diferentes dosis. Las células se incubaron 3 h a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Se aspiró entonces el medio de estimulación, se

my

enjuagaron los pozos con PBS a 4°C y se fijaron las células por adición de 200 µl de PFA (paraformaldehído) al 4% en PBS, durante 15 min, a temperatura ambiente. Se retiró el PFA y se lavaron las células tres veces con 200 µl de PBS. El marcado por los anticuerpos para la detección de fosfo-Erk1/2, directamente, sobre las células Hep3b  
5 comienza con la saturación de los sitios no específicos con 100 µl de tampón de saturación (21,25 ml de PBS, 1,25 ml de suero no inmune de cabra al 10% (Zymed, ref 50-062Z), 75 µl de tritón X 100), durante 2 h. Se reemplazó el tampón de saturación por 50 µl de anticuerpo primario anti-fosfo Erk1/2 (Cell Signaling Technology, ref 4377) diluido al 1/100° en tampón de PBS, BSA al 1%, tritón X 100 al 0,3%. Se incubó el  
10 anticuerpo primario con las células, una noche, a 4°C. Se enjuagó a continuación por 3 lavados de 200 µl de PBS y se reveló con ayuda de un anticuerpo secundario anti-conejo unido a AlexaFluor 488 (Molecular Probes, ref A11008) diluido al 1/5.000° en tampón de PBS, BSA al 1%, tritón X 100 al 0,3%, durante 4 h. A continuación se enjuagó el anticuerpo secundario con 3 lavados de 200 µl de PBS y se añadieron  
15 después 100 µl de PBS a cada pozo. Se leyó la fluorescencia por encima con ayuda de una lectora de placas de tipo EnVision 2103 Multilabel Reader (Perkin Elmer) utilizando el filtro FITC.

Esta técnica permite confirmar que el FGF-19 a 30 ng/ml induce la fosforilación de Erk1/2 en las células Hep3b y que el 40-12 es capaz de bloquear esta estimulación  
20 desde la dosis de 3 µg/ml (Fig. 9C). El FGF-2 así como el suero son igualmente capaces de inducir el sistema. En estos 2 últimos, el anticuerpo 40-12 inhibe el efecto del FGF-2 y del suero a dosis más elevadas (30-100 µg/ml; Fig. 9C).

La detección de fosfo-Erk1/2 por ELISA permitió también demostrar que los anticuerpos anti-FGFR4 activos en el modelo de la angiogénesis *in vitro* son  
25 igualmente capaces de bloquear entre 70 y 95% de la fosforilación de Erk1/2 inducida por el FGF-19 con la dosis de 3 µg/ml (Fig. 9D).

De manera ventajosa, los anticuerpos de la presente invención tienen un efecto antagonista a la vez sobre la angiogénesis patológica asociada al desarrollo del tumor y sobre el crecimiento tumoral hepático propiamente dicho, en particular en un modelo  
30 de hepatocarcinoma.

#### **Ejemplo 8 : Efecto antagonista del anticuerpo 40-12 en el modelo murino de cáncer pancreático**

Para este modelo farmacológico, se utilizaron ratones hembra Rip1-Tag2 (Charles River Laboratory, Francia) de fondo genético C57Bl/6J. Los animales tuvieron  
35 a partir de la semana 9 después del nacimiento, agua de bebida enriquecida con 5%

de sacarosa. Los ratones se trataron de la semana 10 a la semana 12,5 en un protocolo de tratamiento en intervención, una vez por semana, por una inyección por vía sub-cutánea de los anticuerpos anti-FGFR4 40-12 o de control con la dosis de 25 mg/kg (Fig. 14A). Este protocolo fue aprobado por el «Comité de experimentación Animal (Comité del Cuidado y Uso de los Animales)» de Sanofi-Aventis Recherche. Nuestras instalaciones zootécnicas, la atención prestada a los animales así como los protocolos de tratamiento están de acuerdo con los principios impuestos por el convenio europeo sobre la protección de los animales Vertebrados y sometidos a eutanasia después del periodo de tratamiento o cuando la carga tumoral y/o los efectos secundarios obligaran su retirada del estudio.

Para la medición de la carga tumoral, se someten los animales a eutanasia al final de la experiencia y los tumores se microdisecaron a partir del páncreas recién extirpado. Se midió el volumen tumoral en  $\text{mm}^3$  con ayuda de un pie de rey, aplicando la fórmula  $[\text{volumen} = 0,52 \times (\text{anchura})^2 \times (\text{longitud})]$  para aproximarnos al volumen de un esferoide. La carga tumoral para el ratón se calculó por la acumulación del volumen de los tumores de cada ratón.

Para el análisis histoquímico de la densidad vascular, se anestesiaron los animales, se recogieron los páncreas, se fijaron una noche en accustain® (Sigma), después se fijó en parafina. Se prepararon cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor para cada muestra. Se detectaron las células endoteliales por incubación de los cortes con tripsina (Zymed, ref 00-3003), a 37°C, durante 10 min, después con un anticuerpo anti-CD31 de ratón hecho en rata y diluido al 1/50° (BD Pharmingen). Para revelar las regiones marcadas por el anticuerpo, se incubaron los cortes con un anticuerpo anti-rata unido a biotina durante 30 min, después con estreptavidina unida a HRP durante igualmente 30 min (estuche ABC Vectastain®, Vector) y por último con DAB durante 5 min (Vector, ref SK4100). Se marcaron después los cortes con hematoxilina diluida al 1/10° (Dako, S-3309). Se realizaron las tomas de vista con la ayuda de una cámara montada en un microscopio (Nikon, E-800) a un aumento total de 200 veces. Se analizaron las imágenes por un programa (Visiolab, Biocom). Se contaron los vasos sanguíneos en el tumor y se clasificaron en función de su superficie: los vasos pequeños entre 5 y 20  $\mu\text{m}^2$ , los medios entre 21 y 100  $\mu\text{m}^2$  y los grandes a partir de 101  $\mu\text{m}^2$ . Se analizaron dos portaobjetos por páncreas para determinar la densidad vascular que correspondía al número total de elementos marcados por campo.

En este modelo, el tratamiento subcutáneo con la ayuda del anticuerpo anti-FGFR4 40-12 a 25 mg/kg, una vez por semana, entre la décima y la duodécima

semana, permite reducir la carga tumoral de 55% y de manera significativa (Fig 11B) y la tendencia a reducir 34% el número de tumores por páncreas (Fig. 11C), aunque el tratamiento de control no tiene ningún efecto. Esta inhibición del desarrollo tumoral gracias al anticuerpo anti-FGFR4 40-12 va acompañada de una reducción significativa de 31% de la densidad vascular total (Fig. 11D) correspondiendo a una reducción observada del número de vasos sanguíneos en el conjunto de grupos de tamaño de vasos marcados con ayuda de un anticuerpo anti-CD31 (Fig. 11D).

Estos resultados *in vivo* demuestran claramente que un anticuerpo anti-FGFR4 antagonista es capaz de inhibir el reclutamiento y la formación de vasos sanguíneos en el tumor. Esta inhibición de la vascularización tumoral va acompañada de una reducción del número de tumores por páncreas y del volumen tumoral total.

De manera ventajosa, los anticuerpos de la presente invención tienen un efecto antagonista a la vez sobre la angiogénesis patológica y sobre el crecimiento tumoral hepático (en un modelo de hepatocarcinoma) y pancreático.

#### **Ejemplo 9 : Reactividad cruzada del anticuerpo con los FGF-R4 humano, murino y de rata.**

En un primer momento, se realizaron experiencias de competición de unión. Para hacer ésto, se marcó el FGF2 al nivel de 2 cisteínas libres con la ayuda de un AlexaFluor®, 488 nm, C-5 maleimida (Molecular Probes, A10254) según las recomendaciones del proveedor. Este FGF2-AF488 a 10 ng/ml, es capaz de unirse a los FGF-R4 humanos expresados en la superficie de las células 300-19 transfectadas (Fig. 8). Esta unión es específica puesto que la adición en exceso de FGF2 no marcado permite desplazar la interacción FGF2/FGF-R4 (Fig. 8A). Se realizó la misma experiencia volviendo a añadir dosis crecientes del anticuerpo 40-12 o del anticuerpo de muestra 64-12. Sólo el anticuerpo antagonista 40-12 es apto para desplazar la unión FGF2-AF488/FGF-R4 y ésto, con un IC<sub>50</sub> de 3.500 ng/ml o sea 23 nM, que demuestra que el efecto antagonista de este anticuerpo será debido a su capacidad para desplazar la unión FGF/FGF-R4.

En un segundo momento y con el fin de determinar la aptitud del clon 40-12 para bloquear la unión FGF/FGF-R4 en otras especies distintas del ser humano, se realizó una experiencia de disociación utilizando las parejas FGF2/FGF-R4 de ratón, de rata y humano en la referencia. Para hacer ésto, se marcó FGF2 murino (R&D, ref 3139-FB-025) o de rata (R&D, ref 3339-FB-025) de la misma manera que el FGF2 humano por un AlexaFluor 488. Se realizaron experiencias de disociación utilizando las líneas 300-19 transfectadas con los receptores FGF-R4 de ratón o de rata. Los

MS

resultados demuestran que el anticuerpo anti-FGFR4 antagonista 40-12 es capaz de disociar la unión FGF2/FGF-R4 en un sistema ratón o rata con la misma eficacia que en el sistema humano. En efecto, los IC<sub>50</sub> son de 3.500, 4.110 y 3.940 ng/ml o sea 23, 27 y 26 nM, para los complejos FGF2/FGF-R4 humano, murino o de rata, respectivamente (Fig. 13A, 13B y 13C, respectivamente). Esta capacidad para unirse al FGF-R4 de roedores se verificó por ELISA. El anticuerpo 40-12 se une bien también al FGF-R4 humano y murino (Fig.12).

Estos resultados indican que el anticuerpo anti-FGFR4 40-12 se podrá utilizar en modelos farmacológicos en roedores (al menos ratón y rata) y que los resultados obtenidos deberán ser predictivos de la eficacia en el ser humano.

Igualmente, los estudios dirigidos sobre el anticuerpo resultante de los clones 8, 31, 33 y 36 demuestran que estos anticuerpos reconocen a la vez el FGF-R4 humano y el FGF-R4 murino (Tabla 4 a continuación)

Tabla 4: Parámetros cinéticos de unión de los anticuerpos anti-FGFR4 8, 31, 33 y 36 medidos por Resonancia de Plasmón de Superficie (BIAcore 3000) :

|         | sobre h-FGFR4-Histag                   |                         |          | sobre m-FGFR4-Histag                   |                         |          |
|---------|----------------------------------------|-------------------------|----------|----------------------------------------|-------------------------|----------|
|         | Kon (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Koff (s <sup>-1</sup> ) | KD (M)   | Kon (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Koff (s <sup>-1</sup> ) | KD (M)   |
| Clon 8  | 8,93E+05                               | 2,92E-04                | 3,27E-10 | 1,20E+06                               | 1,36E-04                | 1,15E-10 |
| Clon 31 | 6,48E+05                               | 9,80E-04                | 1,52E-09 | 9,14E+05                               | 1,80E-03                | 1,97E-09 |
| Clon 33 | 8,05E+05                               | 6,17E-04                | 7,71E-10 | 1,01E+06                               | 7,04E-04                | 6,92E-10 |
| Clon 36 | 2,44E+05                               | 6,31E-04                | 2,62E-09 | 3,30E+05                               | 7,52E-04                | 2,28E-09 |

Ejemplo 10 : Determinación del epítipo reconocido por los anticuerpos anti-FGF-R4

A- Determinación del epítipo reconocido por el anticuerpo anti-FGFR4 40-12

Se realizó un cribado para determinar el dominio específico del FGFR4 reconocido por el anticuerpo 40-12 por análisis ELISA. Gracias a la utilización de una forma negativa del dominio D1 de FGF-R4 en ELISA, se estableció que el anticuerpo 40-12 interactuó al nivel de los dominios D2-D3 de FGF-R4 (Fig. 12).

Se realizó un segundo cribado por análisis ELISA, utilizando como antígeno de captura las construcciones que contienen o el dominio D1 (SABVA4794) o el dominio D2 (SABVA4796) o el dominio D3 (SABVA4799) de proteína hFGFR4, como se

describe en el ejemplo 2. Se fijó el antígeno de captura en cajas Immulon-4 unido a enzima (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). A continuación se añadió el hibridoma 40-12, se detectó gracias al anticuerpo de conejo anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa (Sigma; ref. A9044-dilución al 1:50.000). El revelado se realizó con el  
5 substrato TMB-H2O2 (Interchim; ref UP664780) y se realizaron las mediciones de densidad óptica (D. O.), a 450 nm. La tabla 5 resume los resultados obtenidos:

Tabla 5: Medición de la unión del anticuerpo 40-12 a los diferentes subdominios de FGF-R4

| Dominio estudiado    | D1<br>SABVA4794 | D2<br>SABVA4796 | D3<br>SABVA4799 | D1-D3<br>FGFR4 -Fc |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Señal (D.O., 450 nm) | 0,185           | 3,000           | 0,105           | 3,000              |

10 El anticuerpo anti-FGFR4 reconoció pues el dominio D2 de la parte extracelular de la proteína FGFR4.

Por otra parte, la proteína FGFR4-Fc desnaturalizada con SDS no fue reconocida por el anticuerpo 40-12 en el análisis por el Método Western, lo que indica  
15 que el epítipo determinado por el 40-12 sobre el dominio D2 de FGFR4 es de tipo conformacional.

B- Determinación del epítipo reconocido por los anticuerpos anti-FGFR4 8, 31, 33, 36.

Se realizó un cribado para determinar el dominio específico del FGFR4  
20 reconocido por los anticuerpos 8, 31, 33, 36 por análisis ELISA, utilizando como antígeno de captura las construcciones que contienen o los dominios D2 y D3 (SEC ID No 42) o la proteína hFGFR4-Histag (SABVA4614, SEC ID N° 40). Se fijó el antígeno de captura en cajas Immulon-4 unido a enzima (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Se añadieron a continuación los sobrenadantes de los cultivos de HEK293  
25 transfectados transitoriamente por plásmidos que permiten la secreción de los anticuerpos 8, 31, 33, 36, después se detectaron gracias al anticuerpo de conejo anti-humano IgG conjugado con peroxidasa (DakoCytomation, ref. P0214-dilución al 1:5.000). El revelado se realizó con el substrato TMB-H2O2 (Interchim; ref UP664780) y las mediciones de densidad óptica (D.O.) se efectuaron a 450 nm. La tabla 6 a  
30 continuación resume los resultados obtenidos:

MF

**Tabla 6:** Unión de los anticuerpos resultantes de los clones 8, 31, 33 y 36 al FGF-R4 entero o al subdominio D2-D3 (señal DO a 450 nm)

|         | hFGFR4-Histag | hFGFR4(D2,D3)-Histag |
|---------|---------------|----------------------|
| Clon 8  | 3,898         | 3,860                |
| Clon 31 | 3,859         | 3,741                |
| Clon 33 | 3,752         | 3,621                |
| Clon 36 | 3,751         | 3,616                |

5            Los anticuerpos 8, 31, 33 y 36 reconocen pues el dominio D2-D3 de la parte extracelular de la proteína FGFR4.

**Tabla 7:** secuencias utilizadas, obtenidas y deducidas

|                         | Secuencias nucleotídicas | Secuencias proteicas   |
|-------------------------|--------------------------|------------------------|
| <b>Anticuerpo 40-12</b> |                          |                        |
| VH + CH                 | SEC ID N° 1              | SEC ID N° 2            |
| VL + CL                 | SEC ID N° 3              | SEC ID N° 4            |
| VH                      | SEC ID N° 5              | SEC ID N° 6            |
| VL                      | SEC ID N° 7              | SEC ID N° 8            |
| CDR VH                  |                          | SEC ID N° 9 ; 10 ; 11  |
| CDR VL                  |                          | SEC ID N° 12 ; 13 ; 14 |
| <b>Anticuerpo 64-12</b> |                          |                        |
| VH + CH                 | SEC ID N° 15             | SEC ID N° 16           |
| VL + CL                 | SEC ID N° 17             | SEC ID N° 18           |
| VH                      | SEC ID N° 19             | SEC ID N° 20           |
| VL                      | SEC ID N° 21             | SEC ID N° 22           |
| CDR VH                  |                          | SEC ID N° 23 ; 24; 25  |
| CDR VL                  |                          | SEC ID N° 26 ; 27 ; 28 |

| Secuencias humanizadas                                                         |                                                                 |                   |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|
| Cadena ligera 1                                                                | SEC ID N° 29                                                    | SEC ID N° 30      |
| Cadena ligera 2                                                                | SEC ID N° 31                                                    | SEC ID N° 32      |
| Cadena pesada 1                                                                | SEC ID N° 33                                                    | SEC ID N° 34      |
| Cadena pesada 2                                                                | SEC ID N° 35                                                    | SEC ID N° 36      |
| Cadena pesada 3                                                                | SEC ID N° 37                                                    | SEC ID N° 38      |
| Construcciones                                                                 |                                                                 |                   |
| hFGFR4-Histag                                                                  | SEC ID N°39                                                     | SEC ID N° 40      |
| hFGFR4-Streptag                                                                | SEC ID N° 68                                                    | SEC ID N° 69      |
| hFGFR4(D2D3)-Histag                                                            | SEC ID N° 41                                                    | SEC ID N° 42      |
| mFGFR4-Histag                                                                  | SEC ID N° 43                                                    | SEC ID N° 44      |
| hFGFR1-Fc                                                                      | SEC ID N° 45                                                    | SEC ID N° 46      |
| hFGFR2-Fc                                                                      | SEC ID N° 47                                                    | SEC ID N° 48      |
| rFGFR4                                                                         | SEC ID N° 49                                                    | SEC ID N° 50      |
| Secuencias de cebadores para el establecimiento de la línea clonal (ejemplo 4) | SEC ID N° 51 ; 52 ; 53 ; 54 ; 55 ; 56 ; 58<br>SEC ID N° 61 ; 62 |                   |
| Dominio transmembrana FGFR4                                                    |                                                                 | SEC ID N° 59 ; 60 |
| Oligonucleótidos cebadores tabla 1                                             | SEC ID N° 63 ; 64 ; 65 ; 66 ; 67                                |                   |
| Epítipo en dominio D2                                                          |                                                                 | SEC ID N° 70      |

151

| Anticuerpo clon 8                                                                 |               |                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------|
| Cadena ligera entera                                                              | SEC ID N° 71  | SEC ID N° 72              |
| Cadena ligera CDR                                                                 |               | SEC ID N° 73 ; 74 ; 75    |
| Cadena pesada entera                                                              | SEC ID N° 76  | SEC ID N° 77              |
| Cadena pesada CDR                                                                 |               | SEC ID N° 78 ; 79; 80     |
| Anticuerpo del clon 31                                                            |               |                           |
| Cadena ligera entera                                                              | SEC ID N° 81  | SEC ID N° 82              |
| Cadena ligera CDR                                                                 |               | SEC ID N° 83 ; 84 ; 85    |
| Cadena pesada entera                                                              | SEC ID N° 86  | SEC ID N° 87              |
| Cadena pesada CDR                                                                 |               | SEC ID N° 88 ; 89 ; 90    |
| Anticuerpo del clon 33                                                            |               |                           |
| Cadena ligera entera                                                              | SEC ID N° 91  | SEC ID N°92               |
| Cadena ligera CDR                                                                 |               | SEC ID N° 93 ; 94 ; 95    |
| Cadena pesada entera                                                              | SEC ID N° 96  | SEC ID N° 97              |
| Cadena pesada CDR                                                                 |               | SEC ID N° 98 ; 99 ; 100   |
| Anticuerpo del clon 36                                                            |               |                           |
| Cadena ligera entera                                                              | SEC ID N° 101 | SEC ID N° 102             |
| Cadena ligera CDR                                                                 |               | SEC ID N° 103 ; 104 ; 105 |
| Cadena pesada entera                                                              | SEC ID N° 106 | SEC ID N° 107             |
| Cadena pesada CDR                                                                 |               | SEC ID N° 108 ; 109 ; 110 |
| Sub-dominios de la parte extracelular de hFGFR4 fusionados al dominio Fc del IgG1 |               |                           |
| fGFGR4_D1::Fc                                                                     | SEC ID N° 111 | SEC ID N° 112             |
| fGFGR4_D2::Fc                                                                     | SEC ID N° 113 | SEC ID N° 114             |
| fGFGR4_D3::Fc                                                                     | SEC ID N° 115 | SEC ID N° 116             |
| Secuencia de región constante de IgG1 humano                                      |               | SEC ID N° 117             |

**REIVINDICACIONES**

1. Antagonista del receptor FGF-R4, caracterizado por que es un anticuerpo que se une de manera específica a FGF-R4
- 5
2. Antagonista según la reivindicación 1, caracterizado por que se une al dominio D2-D3 del receptor FGF-R4.
3. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por
- 10 que se une al dominio D2 del receptor FGF-R4.
4. Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que tiene un  $K_D$  con respecto al receptor FGF-R4 determinado por la técnica Resonancia de Plasmón de Superficie (Biacore) inferior a  $10E-8$  M.
- 15
5. Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es activo a la vez contra FGF-R4 humano y FGF-R4 murino.
6. Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes,
- 20 caracterizado por que es un anticuerpo y comprende al menos una CDR que presenta una secuencia idéntica a una de las secuencias SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ó 110.
- 25
7. Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es un anticuerpo y comprende las CDR de secuencia SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, 13 y 14 ó 73, 74, 75, 78, 79 y 80 ó 83, 84, 85, 88, 89 y 90 ó 93, 94, 95, 98, 99 y 100 ó 103, 104, 105, 108, 109 y 110 o una de las CDR puede diferir en uno a dos aminoácidos con respecto a al menos una de las secuencias citadas
- 30 anteriormente, siempre que el anticuerpo mantenga su especificidad de unión.
8. Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es un anticuerpo cuya parte variable de su cadena pesada comprende una secuencia nucleotídica que presenta al menos el 80% de identidad
- 35 con la secuencia SEC ID N°: 5, 76, 86, 96 ó 106.

5 9. Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es un anticuerpo cuya parte variable de su cadena ligera comprende una secuencia nucleotídica que presenta al menos el 80% de identidad con la secuencia SEC ID N°: 7, 71, 81, 91 ó 101.

10 10. Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es un anticuerpo y por que su secuencia comprende las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 2 y 4 ó 6 y 8 ó 72 y 77 u 82 y 87 ó 92 y 97 ó 102 y 107.

15 11. Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que induce una inhibición de las vías de señalización celular controladas por FGF-R4..

12. Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que induce una inhibición de la angiogénesis.

20 13. Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que induce una inhibición de la proliferación celular tumoral.

25 14. Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que su afinidad por FGF-R4 es 10 veces superior a su afinidad por los otros receptores de FGF.

15. Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que es un anticuerpo humanizado.

30 16. Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que es un anticuerpo humano.

35 17. Antagonista según la reivindicación 15, caracterizado por que comprende una cadena variable ligera que presenta al menos el 80% de identidad con una de las secuencias polipeptídicas SEC ID N° 30 ó 32.

154

18. Antagonista según la reivindicación 15, caracterizado por que comprende una cadena variable pesada que presenta al menos el 80% de identidad con una secuencia SEC ID N° 34, 36 ó 38.

5            19. Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es un anticuerpo y por que está conjugado a un agente citotóxico.

10           20. Utilización de un antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el tratamiento de enfermedades asociadas a una angiogénesis patológica.

15           21. Utilización de un antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el tratamiento de hepatocarcinomas o de cualquier otro tipo de cáncer hepático.

22. Utilización de un antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el tratamiento del cáncer de páncreas.

20           23. Composición farmacéutica que comprende un antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y excipientes.

25           24. Método de tratamiento de una enfermedad unida a una angiogénesis patológica caracterizada por que comprende la administración al paciente de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

25           25. Método de tratamiento de un cáncer caracterizado por que comprende la administración al paciente de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

30

26. Línea celular que produce los anticuerpos según la reivindicación 1 a 19.

35           27. Procedimiento de producción de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado por que comprende poner en cultivo una

155

línea celular según la reivindicación 26.

**28.** Medicamento que comprende un antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

5

**29.** Polinucleótido que codifica un polipéptido que presenta al menos el 80% de identidad con una de las secuencias SEC ID N<sup>os</sup>: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 30, 32, 34, 36, 38, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 107, 108, 109 ó 110.

10

**30.** Polinucleótido caracterizado por que presenta una secuencia que presenta al menos el 80% de identidad con una de las secuencias SEC ID N<sup>os</sup>: 1, 3, 5, 7, 29, 31, 33, 35 ó 37, 71, 76, 81, 86, 91, 96, 101 ó 106.

15

**31.** Vector recombinante que comprende un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 29 y 30.

**32.** Célula anfitriona que comprende un vector según la reivindicación 31.

157

**Resumen:**

La presente invención tiene por objeto moléculas antagonistas específicas del receptor FGF-R4 que permiten inhibir la actividad de este receptor. Estos antagonistas son en particular anticuerpos dirigidos de manera específica contra el receptor FGF-R4, que permiten inhibir la actividad de este receptor. La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización terapéutica de estos anticuerpos, en particular en el dominio de la angiogénesis y en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

10

15

20

25

30

1/22

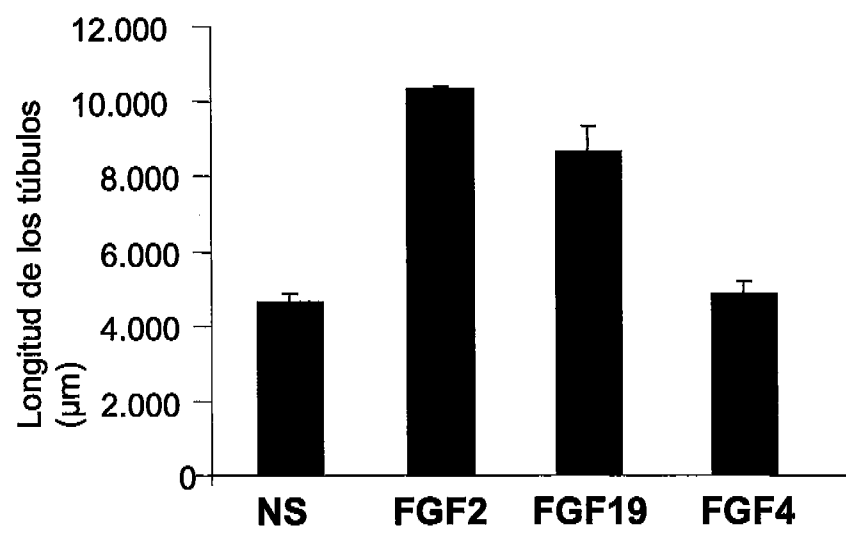


Figura 1A

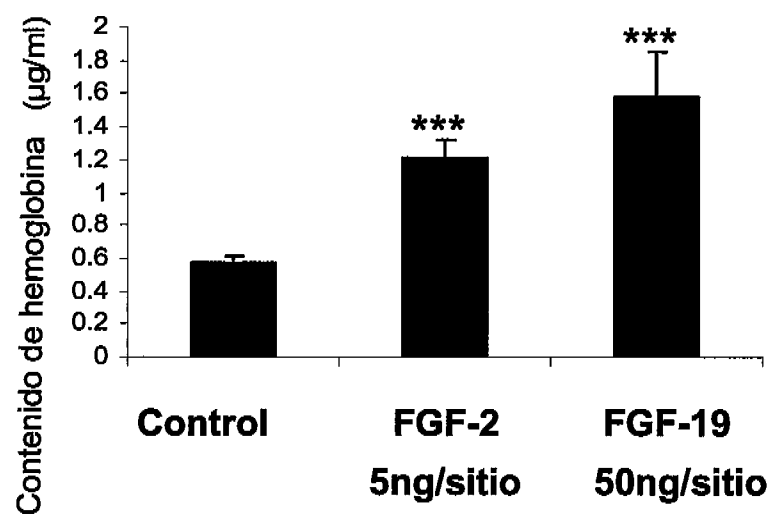


Figura 1B

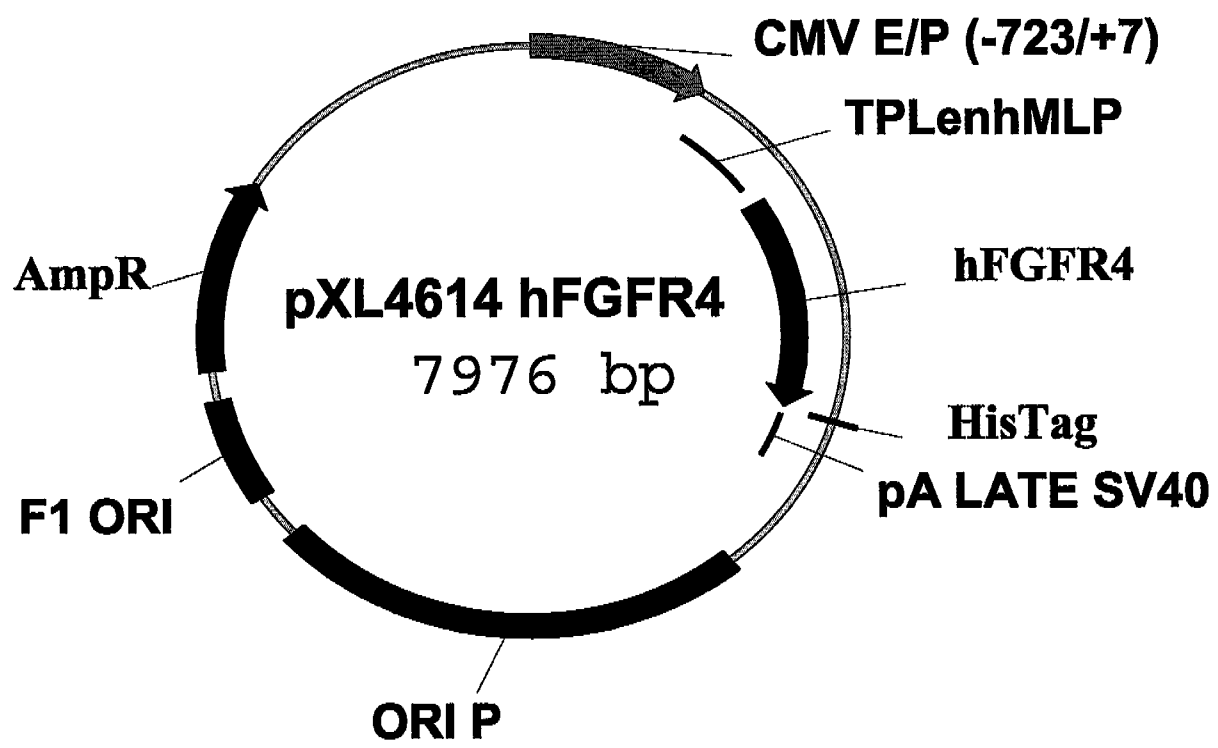


Figura 2A

180

3/22

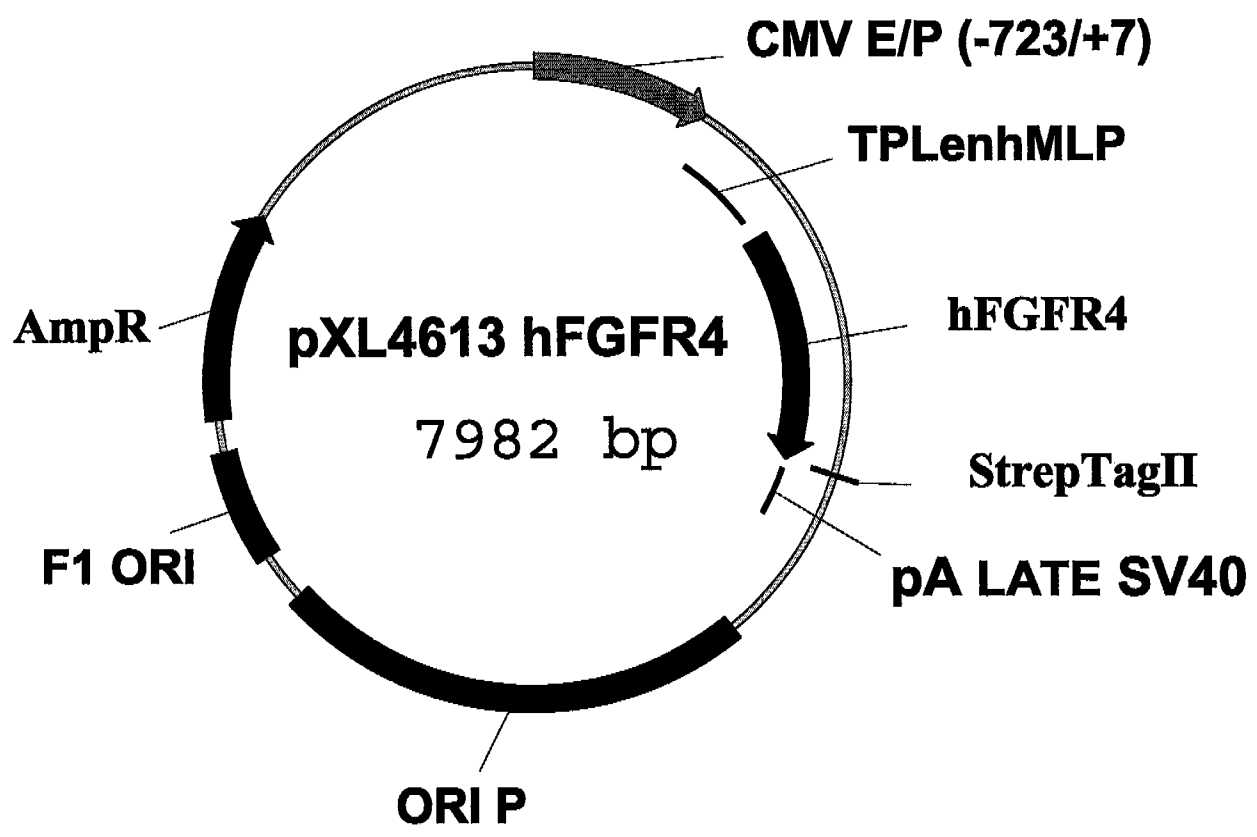


Figura 2B

161

4/22

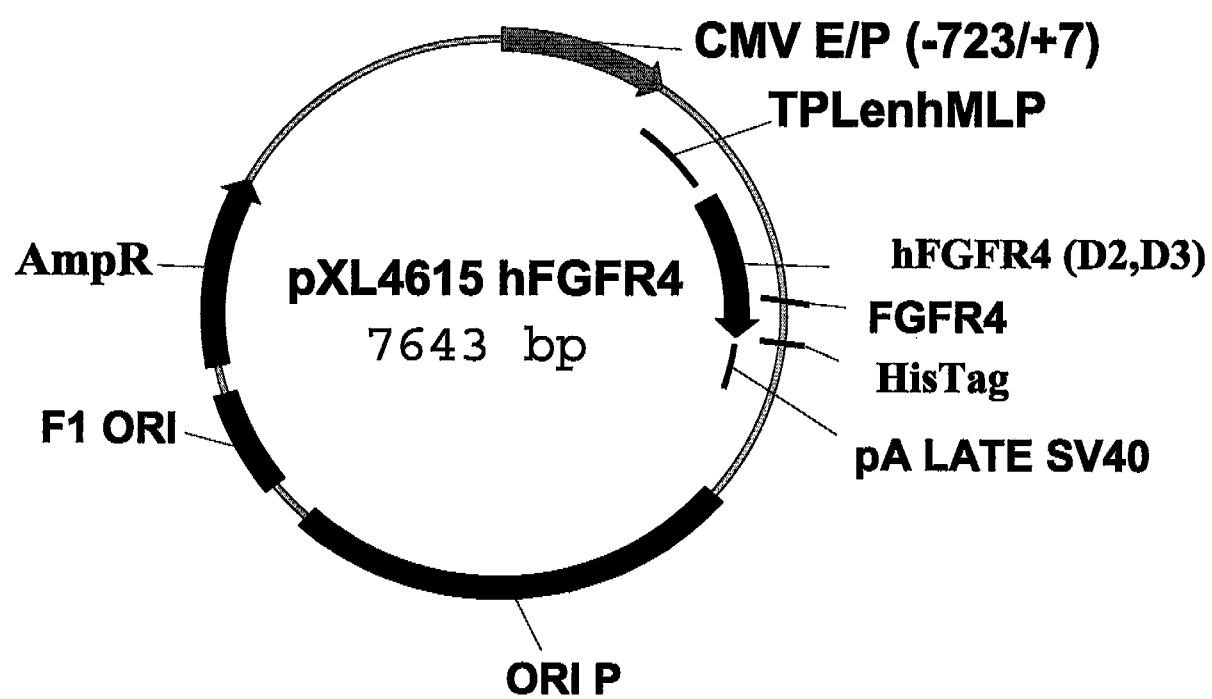


Figura 3

162

5/22

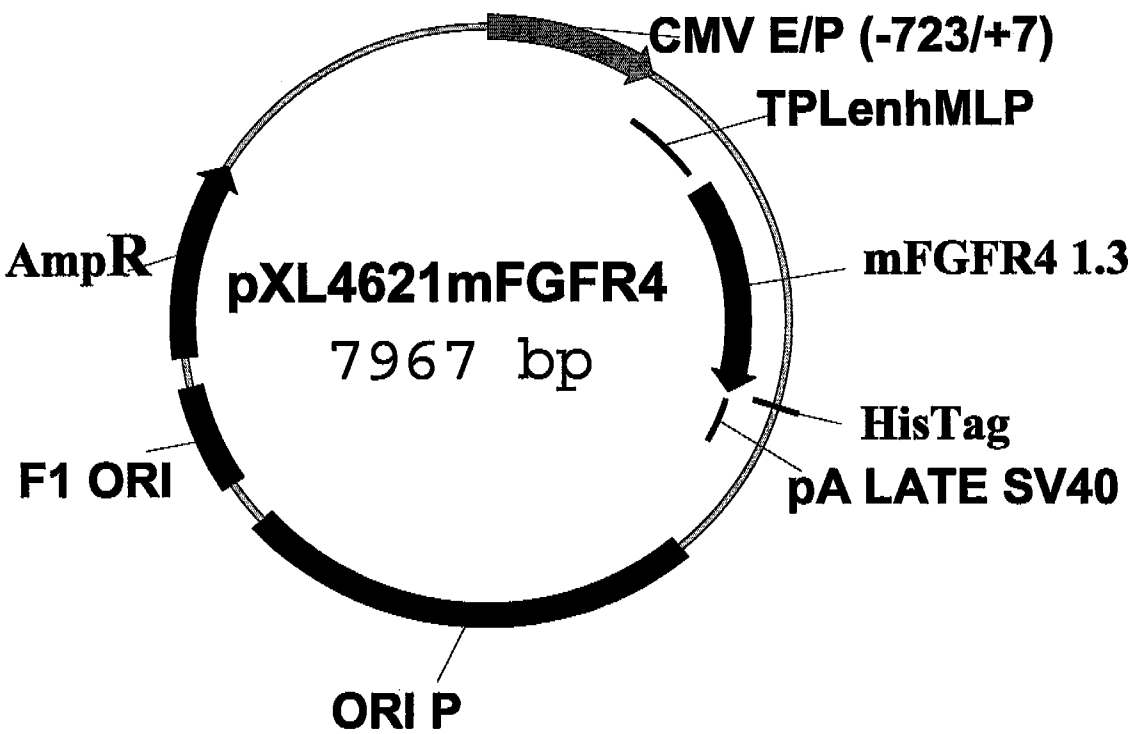


Figura 4

6/22

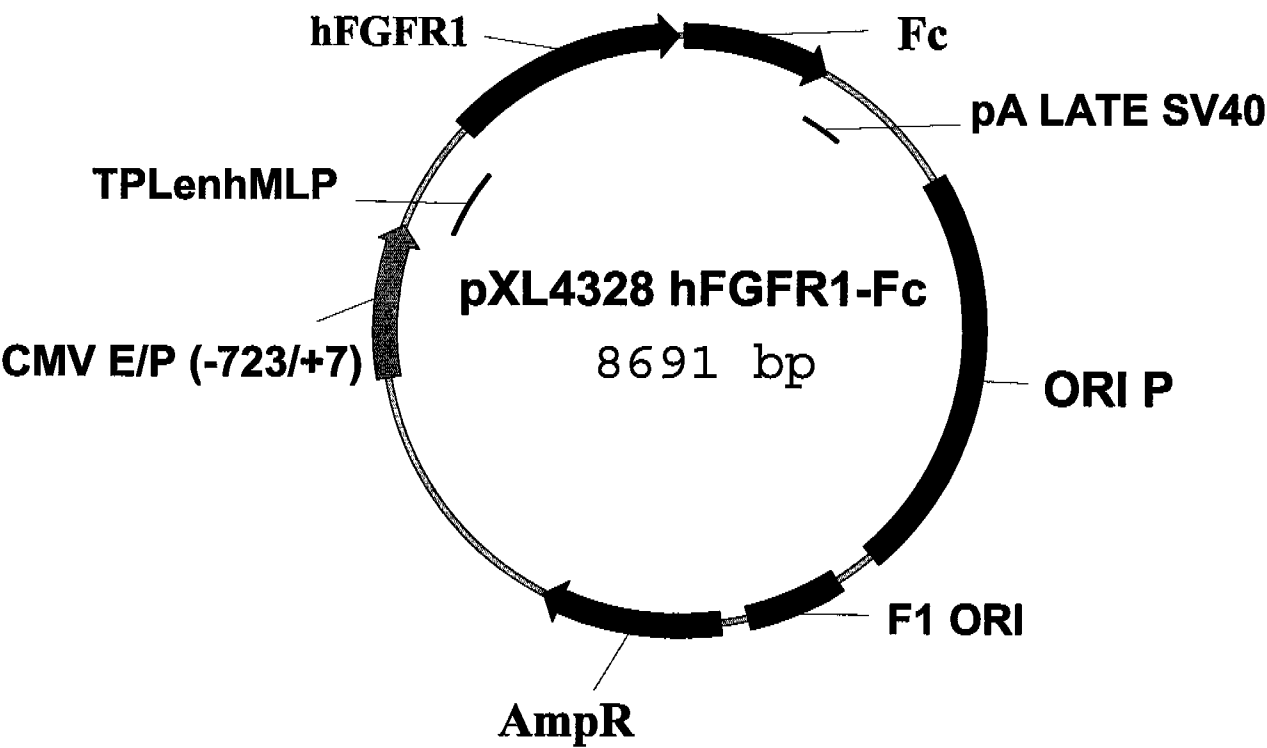


Figura 5

16f

7/22

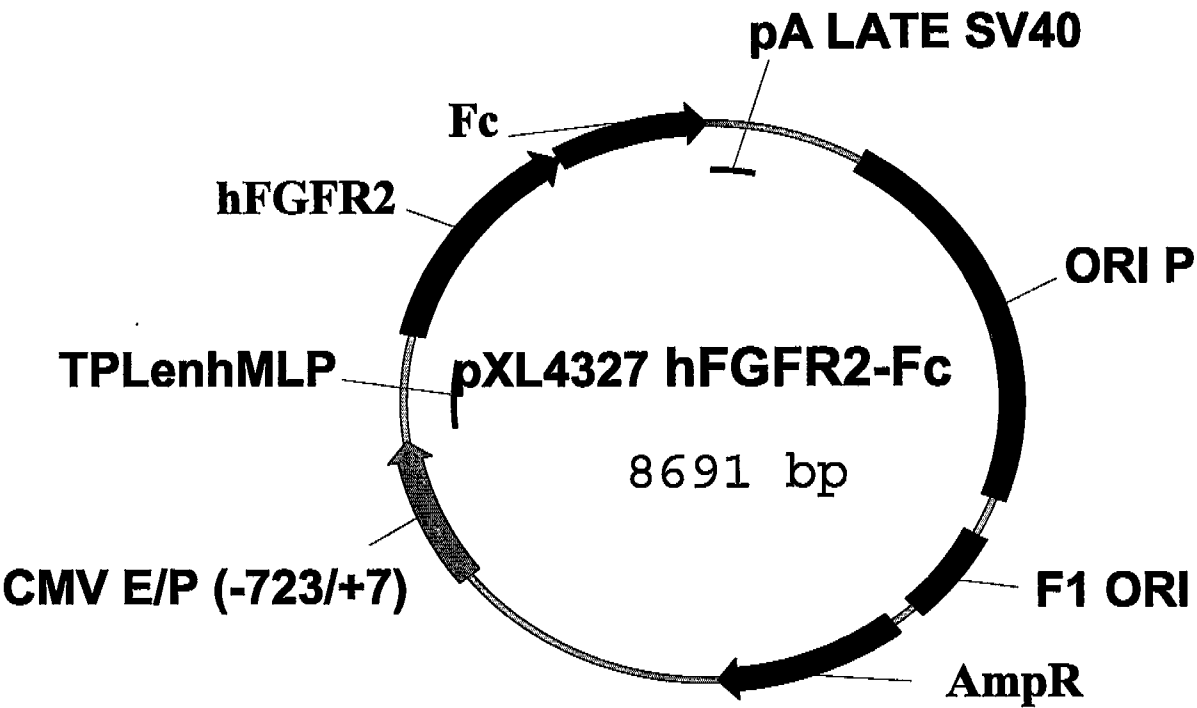


Figura 6

165

8/22

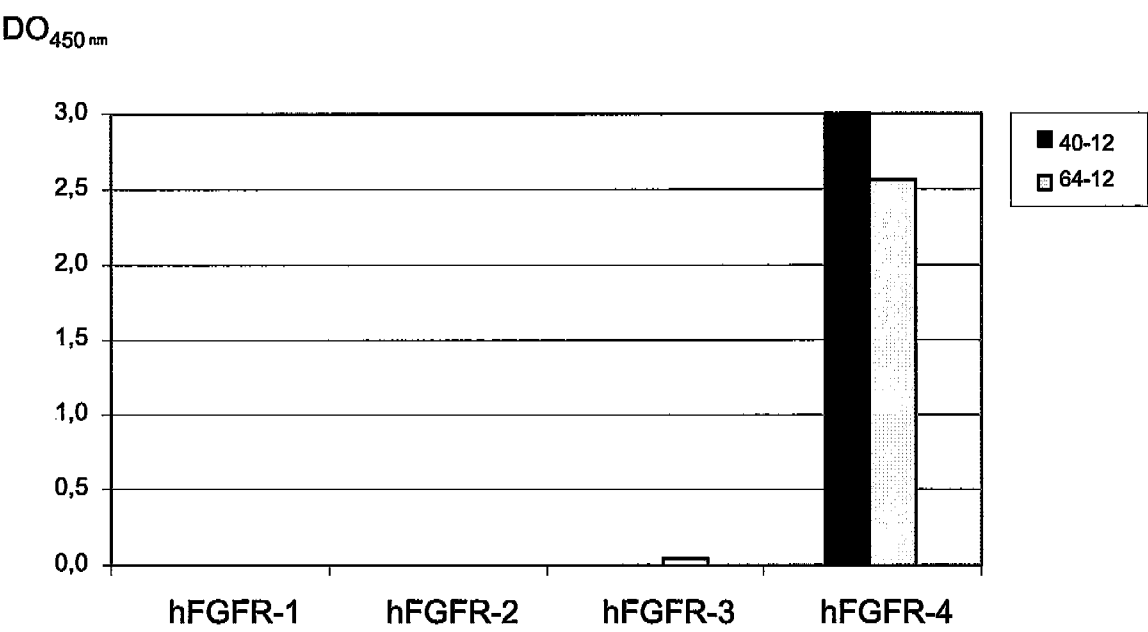


Figura 7

165

9/22

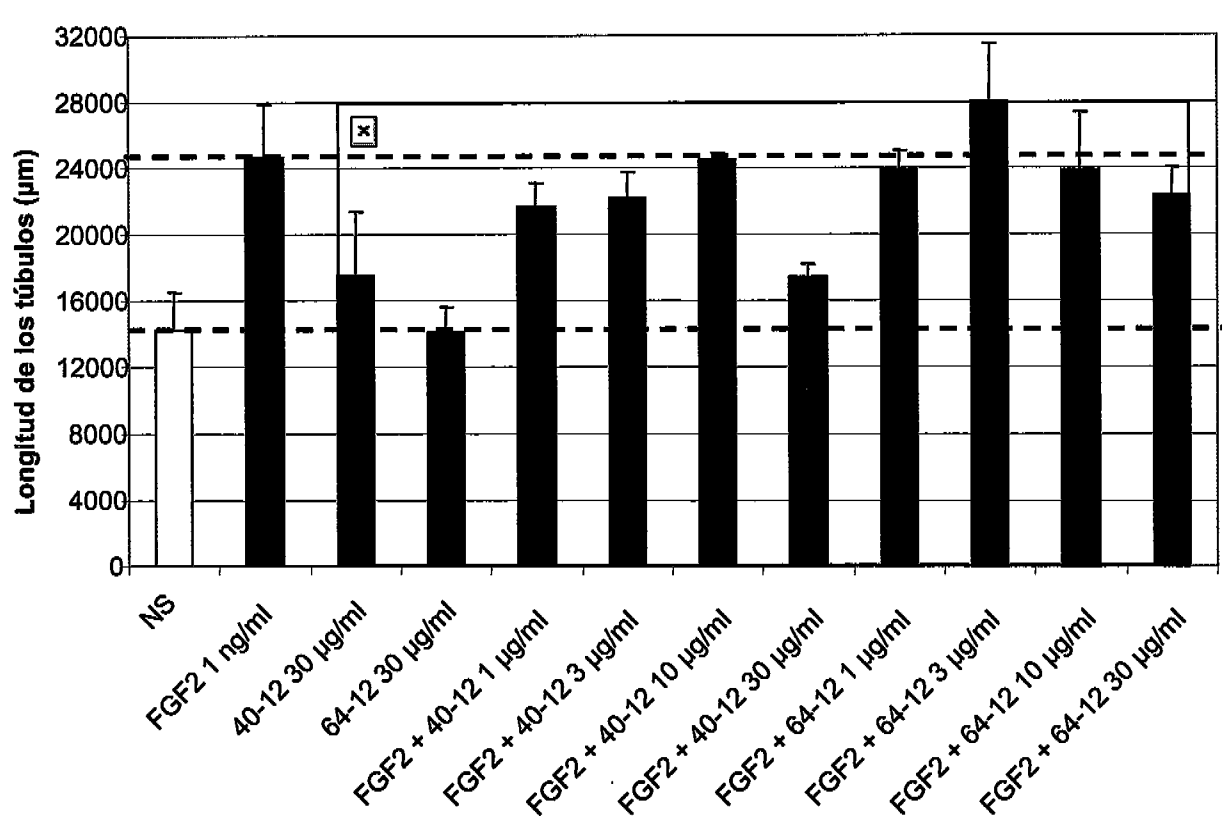


Figura 8A

167

10/22

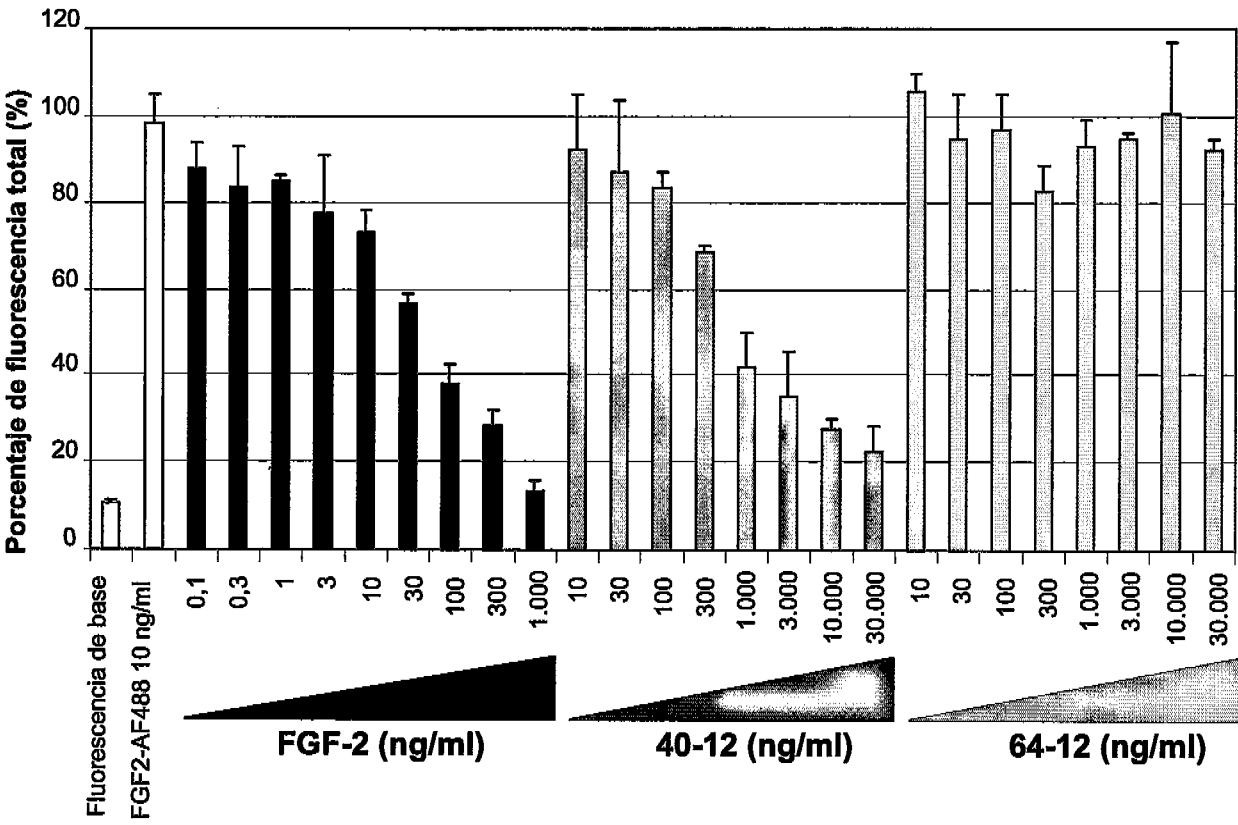


Figura 8B

11/22

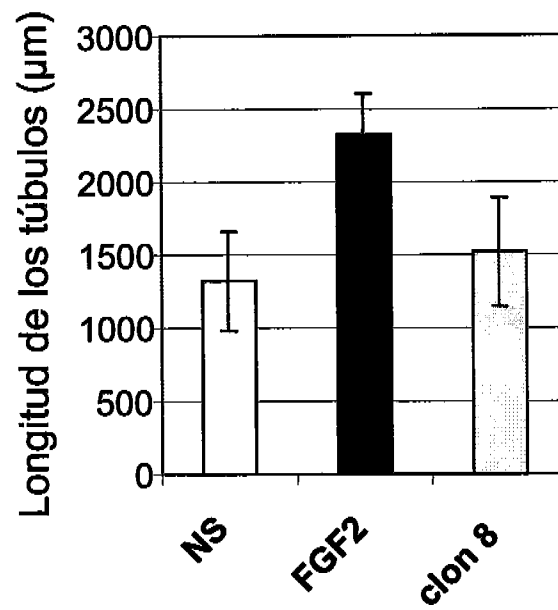


Figura 8C

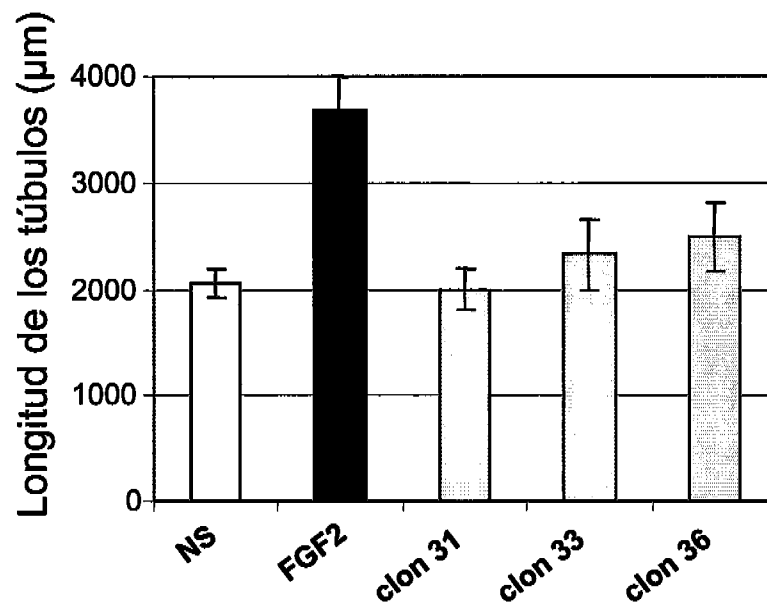


Figura 8D

12/22

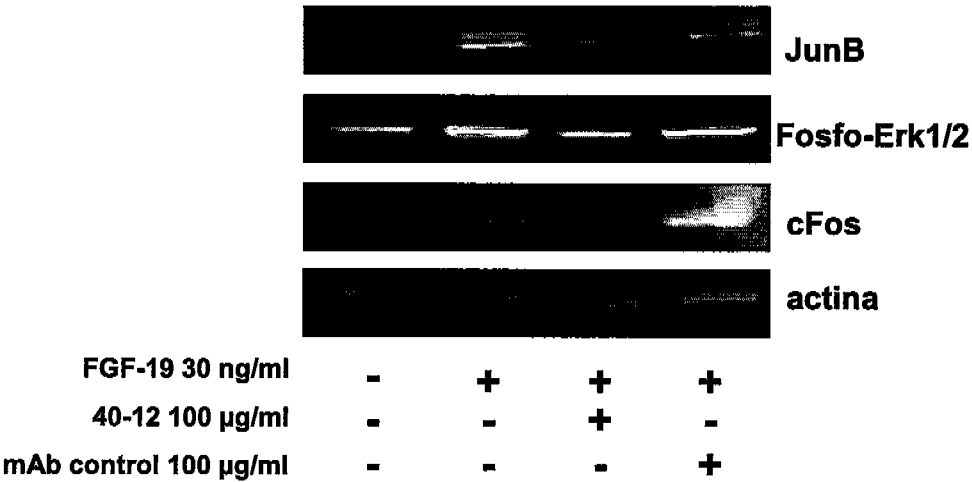


Figura 9A

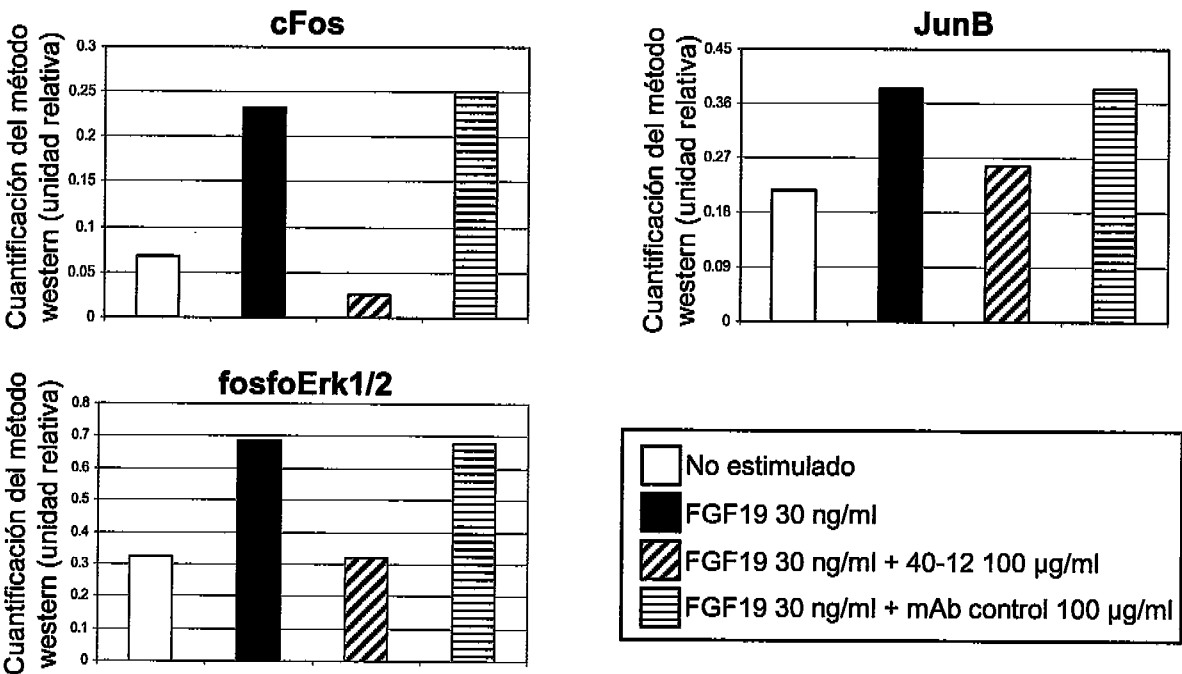


Figura 9B

170

13/22

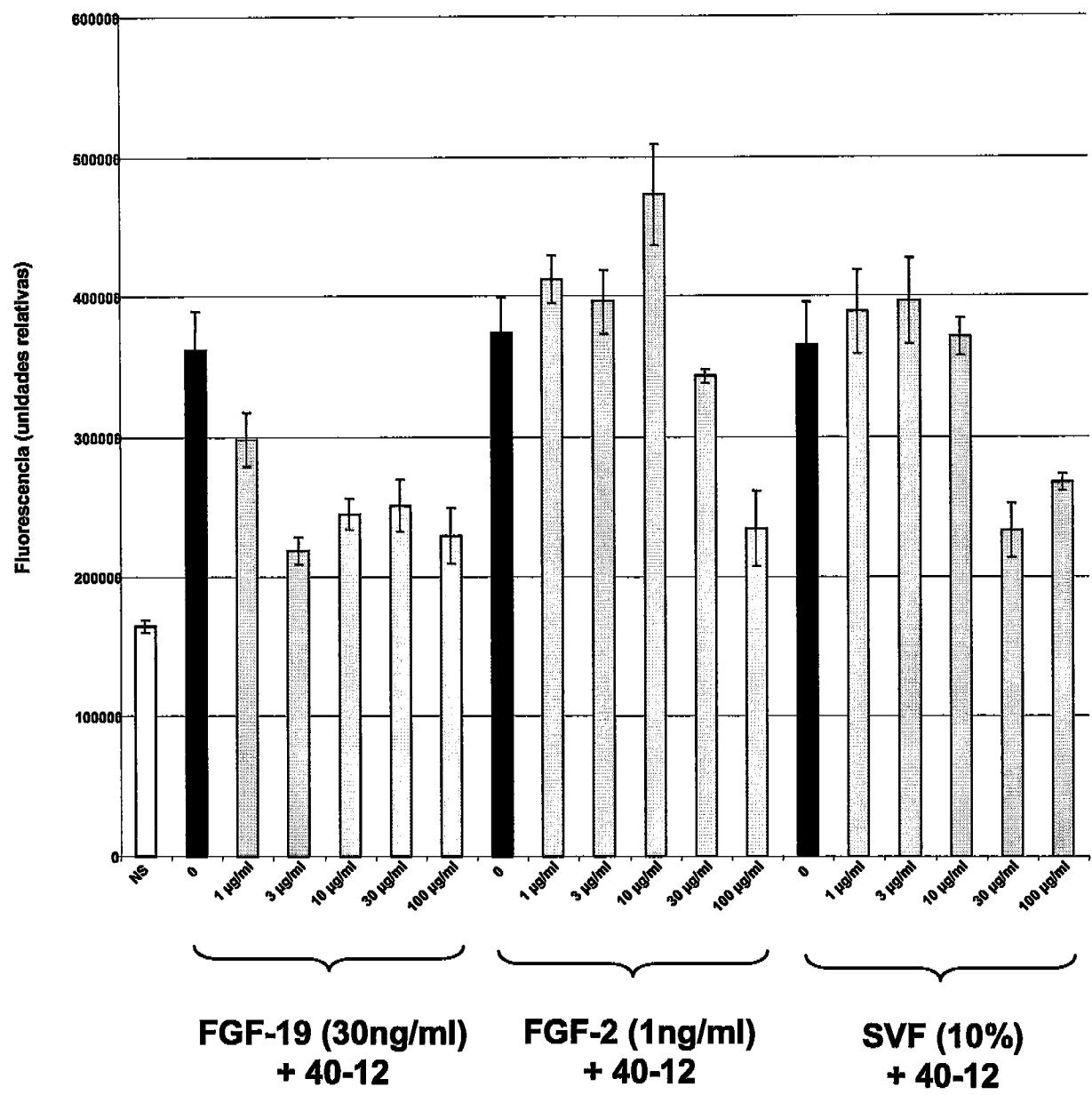


Figura 9C

27

14/22

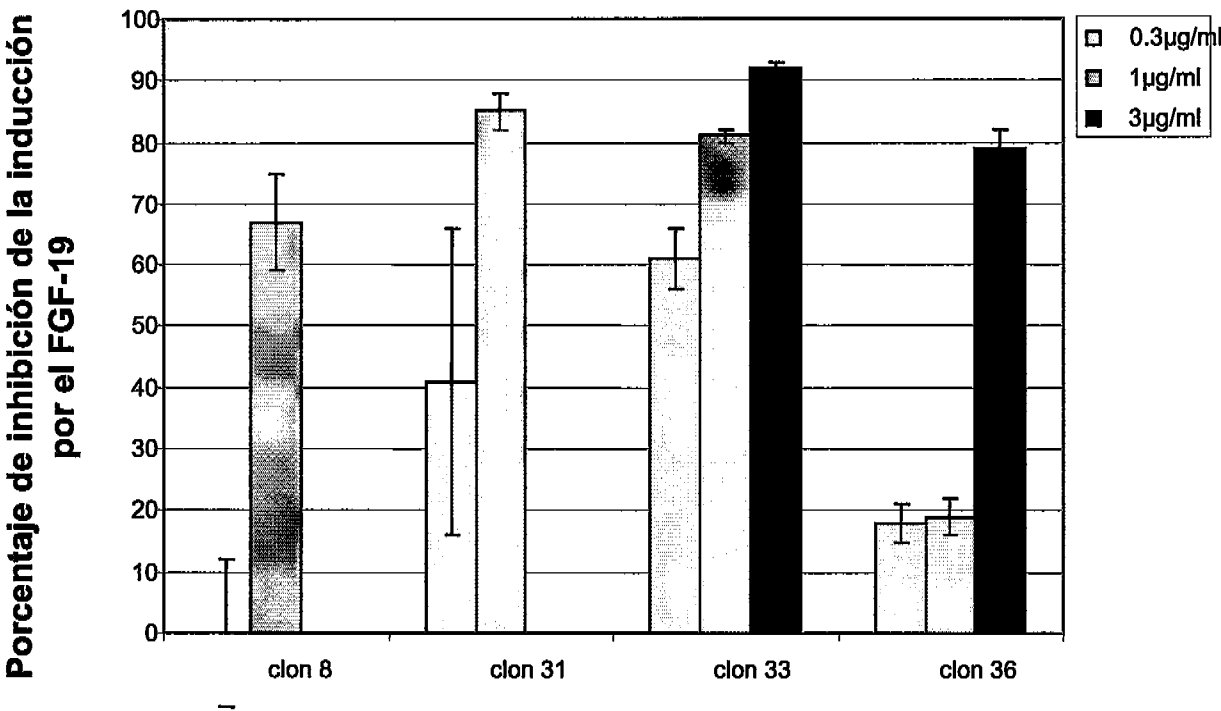


Figura 9D

172

15/22

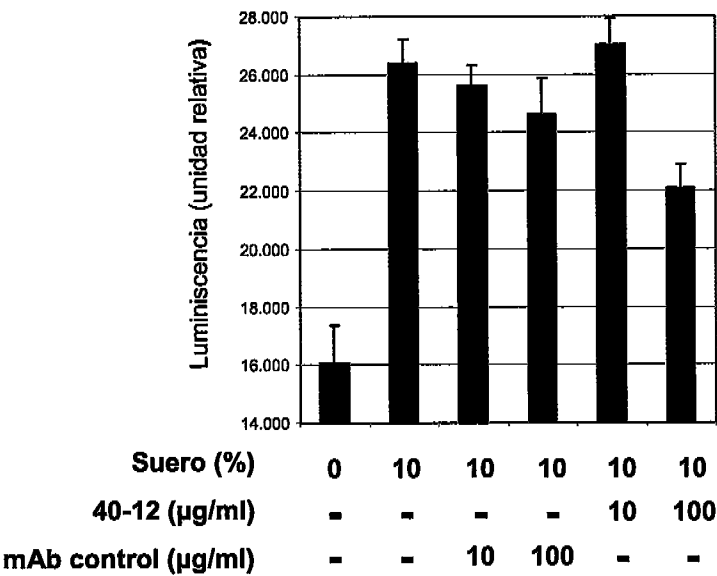


Figura 10A

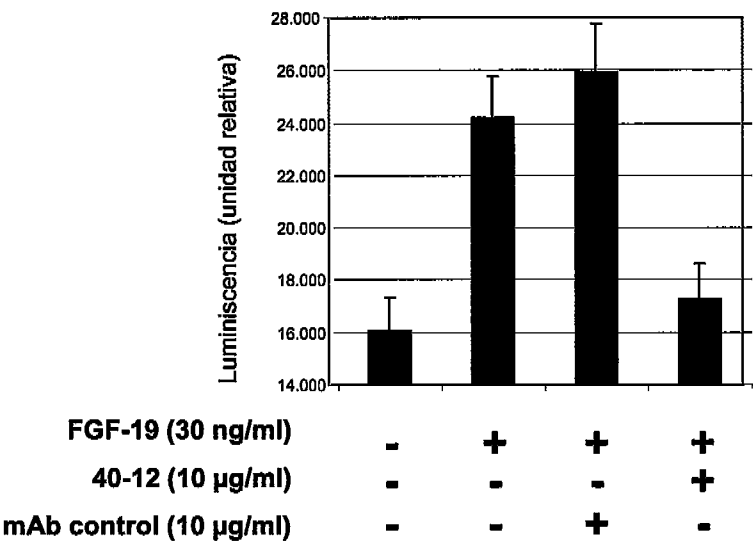


Figura 10B

173

16/22

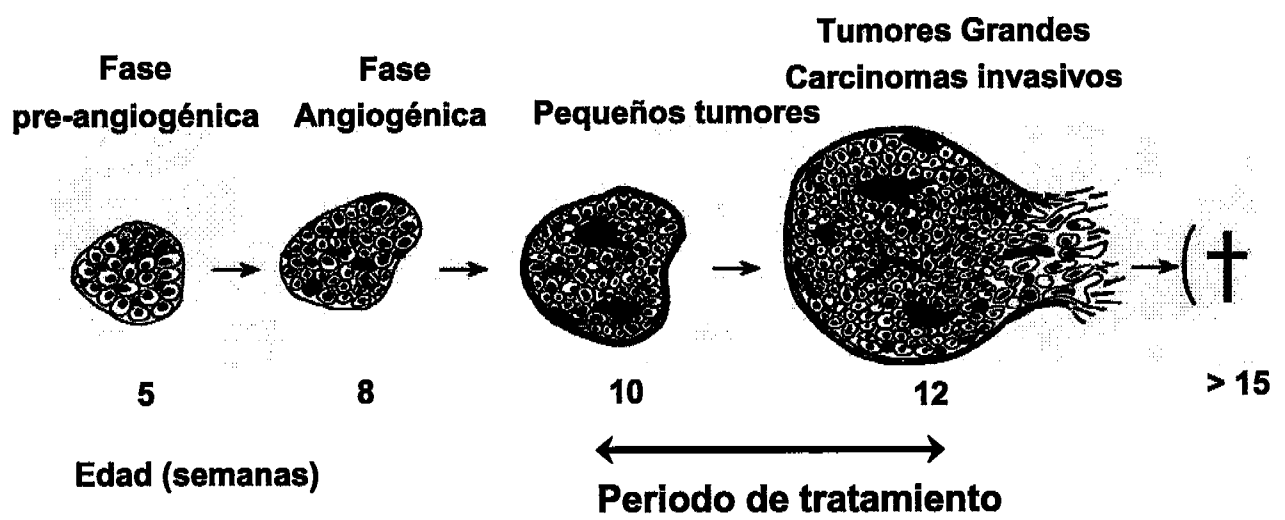


Figura 11 A

174

17/22

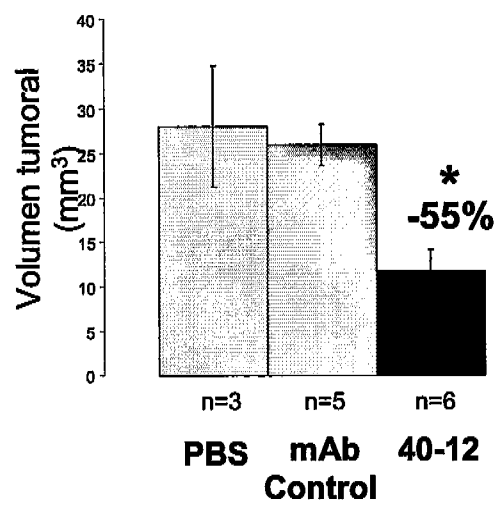


Figura 11B

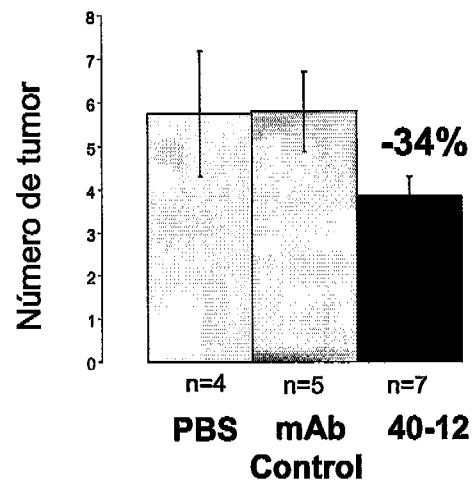


Figura 11C

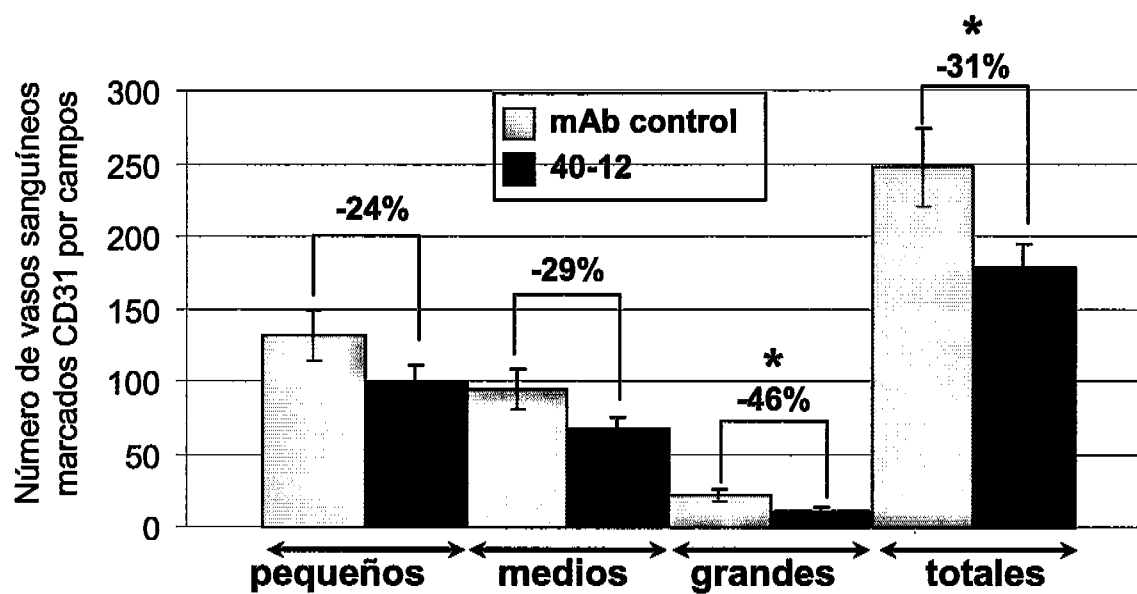


Figura 11D

1.25

18/22

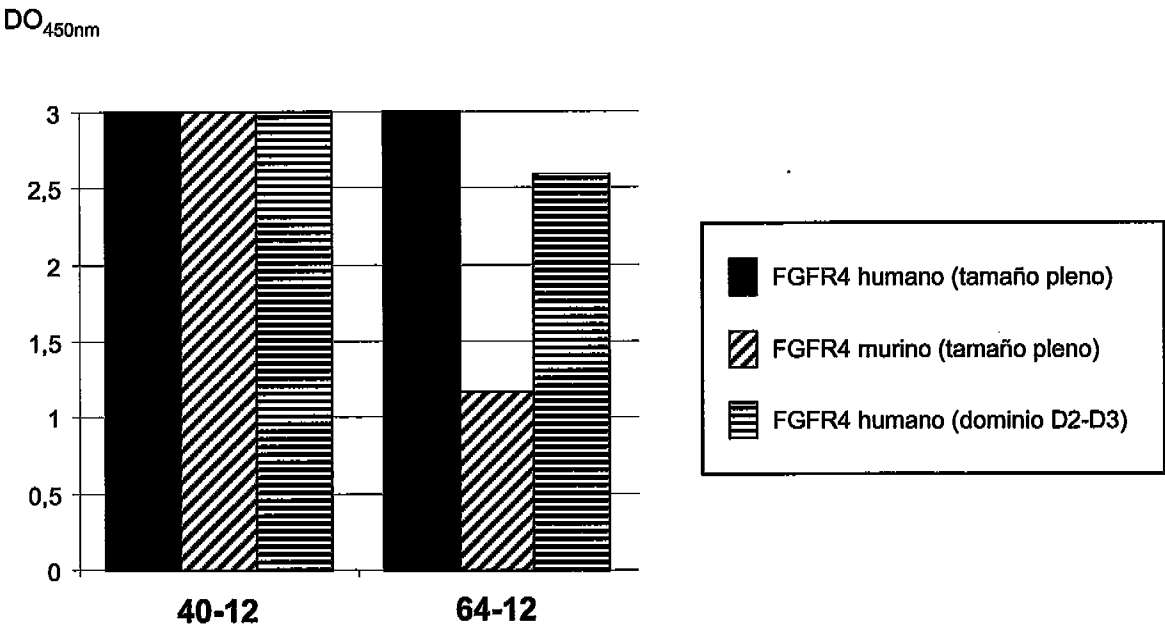


Figura 12

19/22

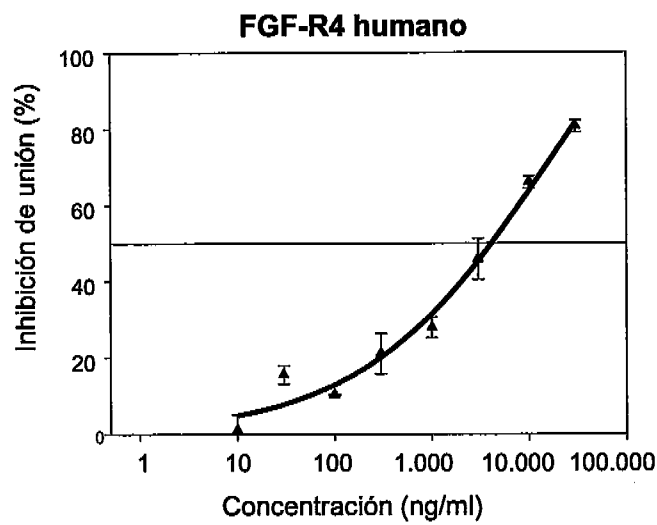


Figura 13A

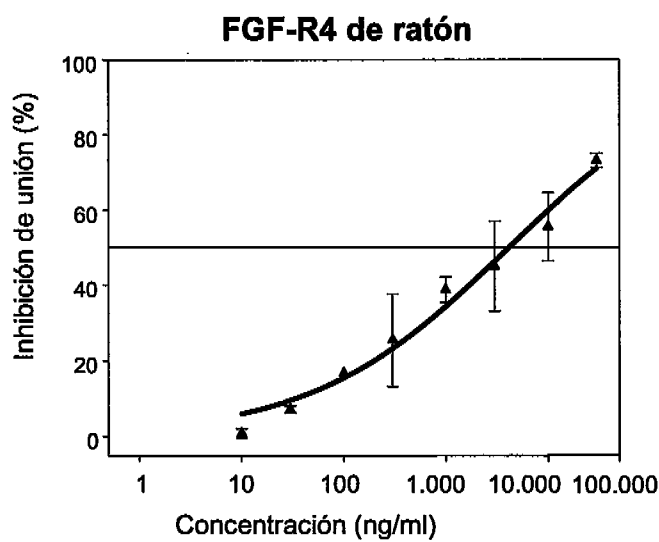


Figura 13B

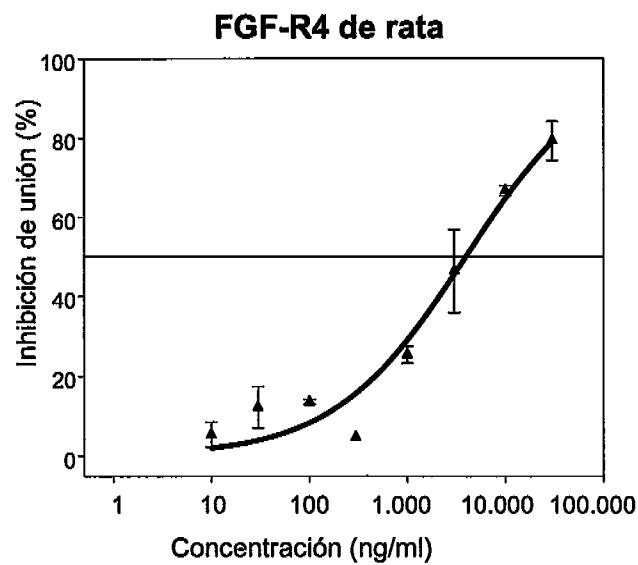


Figura 13C

177

20/22

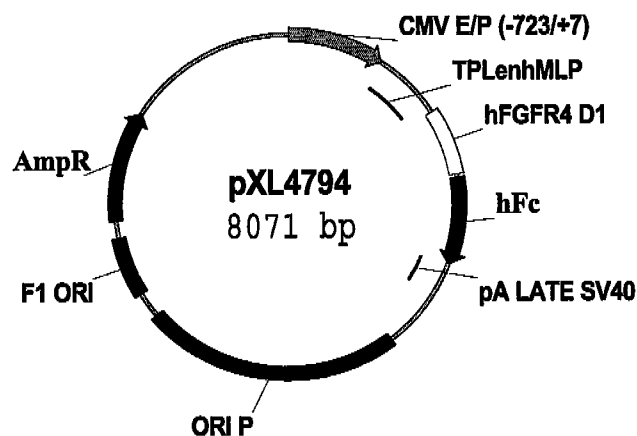


Figura 14A

|     |            |            |            |            |            |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1   | LEASEEVELE | PCLAPSLEQQ | EQELTVALGQ | PVRLCCGRAE | RGGHWYKEGS |
| 51  | RLAPAGRVRG | WRGRLEIASF | LPEDAGRYLC | LARGSMIVLQ | NLTLITGDSL |
| 101 | TSSNDDEDPK | SHRDLSNRHS | YPQQAPYWTH | PORMEKKLHA | VPAGNTVKFR |
| 151 | CPAAGNPTKT | HTCPPCPAPE | LLGGPSVFLF | PPKPKDTLMI | SRTPEVTCVV |
| 201 | VDVSHEDPEV | KFNWYVDGVE | VHNAKTKPRE | EQYNSTYRVV | SVLTVLHQDW |
| 251 | LNGKEYKCKV | SNKALPAPIE | KTISKAKGQP | REPQVYTLPP | SRDELTKNQV |
| 301 | SLTCLVKGFY | PSDIAVEWES | NGQPENNYKT | TPPVLDSDGS | FFLYSKLTVD |
| 351 | KSRWQQGNVF | SCSVMHEALH | NHYTQKSLSL | SPG        |            |

Figura 14B

178

21/22

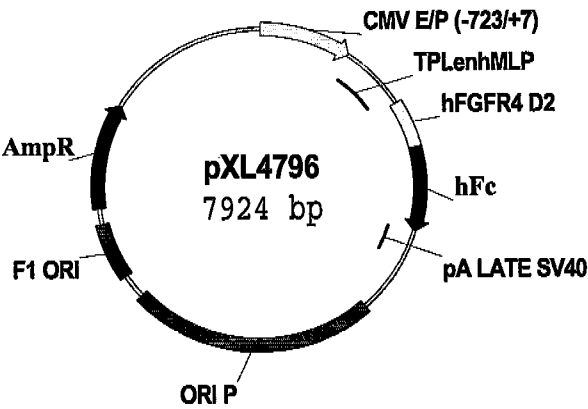


Figura 15A

|     |            |             |            |            |            |
|-----|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 1   | LEASEEVELE | PQAPYWTHPQ  | RMEKKLHAVP | AGNTVKFRCP | AAGNPTPTIR |
| 51  | WLKDGQAFHG | ENRIGGIRLR  | HQHWSLVMES | VVPSDRGTYT | CLVENAVGSI |
| 101 | RYNYLLDVLK | THTCPPCPAP  | ELGGGPSVFL | FPPKPKDTLM | ISRTPEVTCV |
| 151 | VVDVSHEDPE | VKFNWYVDGV  | EVHNAKTKPR | EEQYNSTYRV | VSVLTVLHQD |
| 201 | WLNGKEYKCK | VSINKALPAPI | EKTISKAKGQ | PREPQVYTLP | PSRDELTKNQ |
| 251 | VSLTCLVKGF | YPSDIAVEWE  | SNGQPENNYK | TTPPVLDSDG | SFFLYSKLTV |
| 301 | DKSRWQQGNV | FSCSVMHEAL  | HNHYTQKSLS | LSPG       |            |

Figura 15B

179

22/22

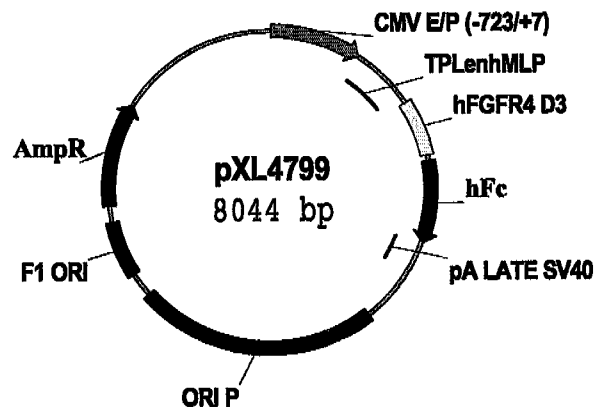


Figura 16A

|     |            |            |            |            |            |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1   | LEASEEVELE | PNAVGSIRYN | YLLDVLERSP | HRPILQAGLP | ANTTAVVGSD |
| 51  | VELLCKVYSD | AQPHIQWLKH | IVINGSSFGA | DGFPYVQVLK | TADINSSEVE |
| 101 | VLYLRNVSAE | DAGEYTCLAG | NSIGLSYQSA | WLTVLPEEDP | TWTAAAPEAK |
| 151 | THTCPPCPAP | ELLGGPSVFL | FPPKPKDTLM | ISRTPEVTCV | VVDVSHEDPE |
| 201 | VKFNWYVDGV | EVHNAKTKPR | EEQYNSTYRV | VSVLTVLHQD | WLNGKEYKCK |
| 251 | VSNKALPAPI | EKTISKAKGQ | PREPQVYTL  | PSRDELTKNQ | VSLTCLVKGF |
| 301 | YPSDIAVEWE | SNGQPENNYK | TTPPVLDSDG | SFFLYSKLTV | DKSRWQQGNV |
| 351 | FSCSVMEAL  | HNHYTQKSL  | LSPG       |            |            |

Figura 16B

180

pctfr2009051343-seq1  
SEQUENCE LISTING

<110> SANOFI-AVENTIS  
<120> Antagonistes spécifiques du récepteur FGF-R4  
<130> FR2008-072 PCT  
<160> 117  
<170> PatentIn version 3.3  
<210> 1  
<211> 1389  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1389)

<400> 1  
atg aac agg ctt act tcc tca ttg ctg ctg ctg att gtc cct gca tat 48  
Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr  
1 5 10 15  
gtc ctg tcc cag gtt act ctg aaa gag tct ggc cct ggg ata ttg cag 96  
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln  
20 25 30  
ccc tcc cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg 144  
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu  
35 40 45  
agc act tct ggt atg ggt gtg agc tgg att cgt cag cct tca gga aag 192  
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys  
50 55 60  
ggg ctg gag tgg ctg gca cac att tac tgg gat gat gac aag cgc tat 240  
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr  
65 70 75 80  
aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc aca atc tcc aag gat acc tcc agc 288  
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser  
85 90 95  
aac cag gta ttc ctc aag atc acc agt gtg gac act gca gat act gcc 336  
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala  
100 105 110  
aca tac tac tgt gct cga gat tac tac gct agt agc ttt gac tac tgg 384  
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Ala Ser Ser Phe Asp Tyr Trp  
115 120 125  
ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gcc aaa acg aca ccc cca 432  
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
130 135 140  
tct gtc tat cca ctg gcc cct gga tct gct gcc caa act aac tcc atg 480  
Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met  
145 150 155 160  
gtg acc ctg gga tgc ctg gtc aag ggc tat ttc cct gag cca gtg aca 528  
Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
165 170 175  
gtg acc tgg aac tct gga tcc ctg tcc agc ggt gtg cac acc ttc cca 576  
Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
180 185 190  
gct gtc ctg cag tct gac ctc tac act ctg agc agc tca gtg act gtc 624  
Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
195 200 205

181

|                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| pctfr2009051343-seq1 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 672  |
| ccc                  | tcc | agc | acc | tgg | ccc | agc | gag | acc | gtc | acc | tgc | aac | ggt | gcc | cac |      |
| Pro                  | Ser | Ser | Thr | Trp | Pro | Ser | Glu | Thr | Val | Thr | Cys | Asn | Val | Ala | His |      |
| 210                  |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |      |
| ccg                  | gcc | agc | agc | acc | aag | gtg | gac | aag | aaa | att | gtg | ccc | agg | gat | tgt | 720  |
| Pro                  | Ala | Ser | Ser | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Ile | Val | Pro | Arg | Asp | Cys |      |
| 225                  |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |
| ggt                  | tgt | aag | cct | tgc | ata | tgt | aca | gtc | cca | gaa | gta | tca | tct | gtc | ttc | 768  |
| Gly                  | Cys | Lys | Pro | Cys | Ile | Cys | Thr | Val | Pro | Glu | Val | Ser | Ser | Val | Phe |      |
|                      |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |
| atc                  | ttc | ccc | cca | aag | ccc | aag | gat | gtg | ctc | acc | att | act | ctg | act | cct | 816  |
| Ile                  | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Val | Leu | Thr | Ile | Thr | Leu | Thr | Pro |      |
|                      |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |      |
| aag                  | gtc | acg | tgt | gtt | gtg | gta | gac | atc | agc | aag | gat | gat | ccc | gag | gtc | 864  |
| Lys                  | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Ile | Ser | Lys | Asp | Asp | Pro | Glu | Val |      |
|                      |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |
| cag                  | ttc | agc | tgg | ttt | gta | gat | gat | gtg | gag | gtg | cac | aca | gct | cag | acg | 912  |
| Gln                  | Phe | Ser | Trp | Phe | Val | Asp | Asp | Val | Glu | Val | His | Thr | Ala | Gln | Thr |      |
|                      | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |
| caa                  | ccc | cgg | gag | gag | cag | ttc | aac | agc | act | ttc | cgc | tca | gtc | agt | gaa | 960  |
| Gln                  | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Phe | Arg | Ser | Val | Ser | Glu |      |
| 305                  |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| ctt                  | ccc | atc | atg | cac | cag | gac | tgg | ctc | aat | ggc | aag | gag | ttc | aaa | tgc | 1008 |
| Leu                  | Pro | Ile | Met | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Phe | Lys | Cys |      |
|                      |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| agg                  | gtc | aac | agt | gca | gct | ttc | cct | gcc | ccc | atc | gag | aaa | acc | atc | tcc | 1056 |
| Arg                  | Val | Asn | Ser | Ala | Ala | Phe | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |      |
|                      |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| aaa                  | acc | aaa | ggc | aga | ccg | aag | gct | cca | cag | gtg | tac | acc | att | cca | cct | 1104 |
| Lys                  | Thr | Lys | Gly | Arg | Pro | Lys | Ala | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Ile | Pro | Pro |      |
|                      |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| ccc                  | aag | gag | cag | atg | gcc | aag | gat | aaa | gtc | agt | ctg | acc | tgc | atg | ata | 1152 |
| Pro                  | Lys | Glu | Gln | Met | Ala | Lys | Asp | Lys | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Met | Ile |      |
|                      | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |
| aca                  | gac | ttc | ttc | cct | gaa | gac | att | act | gtg | gag | tgg | cag | tgg | aat | ggg | 1200 |
| Thr                  | Asp | Phe | Phe | Pro | Glu | Asp | Ile | Thr | Val | Glu | Trp | Gln | Trp | Asn | Gly |      |
|                      | 385 |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |      |
| cag                  | cca | gcg | gag | aac | tac | aag | aac | act | cag | ccc | atc | atg | gac | aca | gat | 1248 |
| Gln                  | Pro | Ala | Glu | Asn | Tyr | Lys | Asn | Thr | Gln | Pro | Ile | Met | Asp | Thr | Asp |      |
|                      |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |      |
| ggc                  | tct | tac | ttc | gtc | tac | agc | aag | ctc | aat | gtg | cag | aag | agc | aac | tgg | 1296 |
| Gly                  | Ser | Tyr | Phe | Val | Tyr | Ser | Lys | Leu | Asn | Val | Gln | Lys | Ser | Asn | Trp |      |
|                      |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |      |
| gag                  | gca | gga | aat | act | ttc | acc | tgc | tct | gtg | tta | cat | gag | ggc | ctg | cac | 1344 |
| Glu                  | Ala | Gly | Asn | Thr | Phe | Thr | Cys | Ser | Val | Leu | His | Glu | Gly | Leu | His |      |
|                      |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |      |
| aac                  | cac | cat | act | gag | aag | agc | ctc | tcc | cac | tct | cct | ggt | aag | tga |     | 1389 |
| Asn                  | His | His | Thr | Glu | Lys | Ser | Leu | Ser | His | Ser | Pro | Gly | Lys |     |     |      |
|                      | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |      |

<210> 2  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 <400> 2

Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr  
 1 5 10 15

782

pctfr2009051343-seq1

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln  
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu  
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys  
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr  
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser  
85 90 95

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala  
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Ala Ser Ser Phe Asp Tyr Trp  
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
130 135 140

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met  
145 150 155 160

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
165 170 175

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
195 200 205

Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His  
210 215 220

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys  
225 230 235 240

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe  
245 250 255

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro  
260 265 270

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val  
275 280 285

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr  
290 295 300

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu  
305 310 315 320



pctfr2009051343--seq1

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys  
325 330 335

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
340 345 350

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro  
355 360 365

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile  
370 375 380

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly  
385 390 395 400

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp  
405 410 415

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp  
420 425 430

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His  
435 440 445

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
450 455 460

<210> 3  
<211> 705  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(705)

<400> 3  
atg gtt ttc aca cct cag att ctt gga ctt atg ctt ttc tgg att tca 48  
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser  
1 5 10 15

gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct 96  
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
20 25 30

gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt 144  
Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca 192  
Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro  
50 55 60

agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc 240  
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser  
65 70 75 80

agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc att ctc agt ttc aac 288  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Ser Phe Asn  
85 90 95

agt gtg gag act gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac 336  
Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn  
100 105 110 115 120

(84)

pctfr2009051343-seq1  
105

100

110

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| agc | tgg | cct | ttc | acg | ttc | ggc | tgc | ggg | aca | aaa | ttg | gaa | ata | aaa | cgg | 384 |
| Ser | Trp | Pro | Phe | Thr | Phe | Gly | Ser | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg |     |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| gct | gat | gct | gca | cca | act | gta | tcc | atc | ttc | cca | cca | tcc | agt | gag | cag | 432 |
| Ala | Asp | Ala | Ala | Pro | Thr | Val | Ser | Ile | Phe | Pro | Pro | Ser | Ser | Glu | Gln |     |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| tta | aca | tct | gga | ggg | gcc | tca | gtc | gtg | tgc | ttc | ttg | aac | aac | ttc | tac | 480 |
| Leu | Thr | Ser | Gly | Gly | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Phe | Leu | Asn | Asn | Phe | Tyr |     |
|     | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |
| ccc | aaa | gac | atc | aat | gtc | aag | tgg | aag | att | gat | ggc | agt | gaa | cga | caa | 528 |
| Pro | Lys | Asp | Ile | Asn | Val | Lys | Trp | Lys | Ile | Asp | Gly | Ser | Glu | Arg | Gln |     |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |
| aat | ggc | gtc | ctg | aac | agt | tgg | act | gat | cag | gac | agc | aaa | gac | agc | acc | 576 |
| Asn | Gly | Val | Leu | Asn | Ser | Trp | Thr | Asp | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser | Thr |     |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |
| tac | agc | atg | agc | agc | acc | ctc | acg | ttg | acc | aag | gac | gag | tat | gaa | cga | 624 |
| Tyr | Ser | Met | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Thr | Lys | Asp | Glu | Tyr | Glu | Arg |     |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| cat | aac | agc | tat | acc | tgt | gag | gcc | act | cac | aag | aca | tca | act | tca | ccc | 672 |
| His | Asn | Ser | Tyr | Thr | Cys | Glu | Ala | Thr | His | Lys | Thr | Ser | Thr | Ser | Pro |     |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| att | gtc | aag | agc | ttc | aac | agg | aat | gag | tgt | taa |     |     |     |     |     | 705 |
| Ile | Val | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Asn | Glu | Cys |     |     |     |     |     |     |     |
|     | 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 4  
<211> 234  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 4

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

130 135 140  
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln  
 165 170 175  
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190  
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg  
 195 200 205  
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro  
 210 215 220  
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 225 230

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| $\langle 210 \rangle$ | 5       |
| $\langle 211 \rangle$ | 442     |
| $\langle 212 \rangle$ | DNA     |
| $\langle 213 \rangle$ | Mus sp. |

<220>  
<221> CDS  
<222> (29)..(442)

```

<400> 5
tgaaggagta gaaaactagt gtgcagat atg aac agg ctt act tcc tca ttg      52
                               Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu
                               1           5

```

ctg ctg ctg att gtc cct gca tat gtc ctg tcc cag gtt act ctg aaa 100  
Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys  
10 15 20

gag tct ggc cct ggg ata ttg cag ccc tcc cag acc ctc agt ctg act 148  
Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr  
25 30 35 40

tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg agc act tct ggt atg ggt gtg agc 196  
Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser  
45 50 55

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ttg | att | cgt | cag | cct | tca | gga | aag | ggt | ctg | gag | tgg | ctg | gca | cac | att | 244 |
| Trp | Ile | Arg | Gln | Pro | Ser | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Leu | Ala | His | Ile |     |
|     |     |     | 60  |     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |

tac tgg gat gat gac aag cgc tat aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc 292  
 Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu  
 75 80 85

aca atc tcc aag gat acc tcc agc aac cag gta ttc ctc aag atc acc 340  
Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr  
90 95 100

agt gtg gac act gca gat act gcc aca tac tac tgt gct cga gat tac 388  
Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr  
105 110 115 120

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| tac | gct | agt | agc | ttt | gac | tac | tgg | ggc | caa | ggc | acc | act | ctc | aca | gtc | 436 |
| Tyr | Ala | Ser | Ser | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Leu | Thr | Val |     |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |

tcc tca 442

186

pctfr2009051343-seq1

Ser Ser

<210> 6  
<211> 138  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 6

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

<210> 7  
<211> 401  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CDS  
<222> (18)..(401)

<400> 7

tcagggaaag ctcgaag atg gtt ttc aca cct cag att ctt gga ctt atg 50  
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met  
1 5 10  
ctt ttc tgg att tca gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct 98  
Leu Phe Trp Ile Ser Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
15 20 25  
cca gcc acc ctg tct gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc 146  
Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys  
30 35 40  
agg gcc agt caa agt att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa 194  
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys  
45 50 55  
tca cat gag tct cca agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc 242

187

pctfr2009051343-seq1

Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile  
60 65 70 75  
tct ggg atc ccc tcc agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc 290  
Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
80 85 90  
att ctc agt ttc aac agt gtg gag act gaa gat ttt gga atg tat ttc 338  
Ile Leu Ser Phe Asn Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe  
95 100 105  
tgt caa cag agt aac agc tgg cct ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aaa 386  
Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys  
110 115 120  
ttg gaa ata aaa cgg 401  
Leu Glu Ile Lys Arg  
125

<210> 8  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 8

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

<210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 9

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser  
1 5

<210> 10  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

188

pctfr2009051343-seq1

<400> 10

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 11

Asp Tyr Tyr Ala Ser Ser Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 12  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu His  
1 5 10

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 13

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
1 5

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 14

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr  
1 5

<210> 15  
<211> 1395  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1395)

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 15                                                        |     |
| atg gac tcc agg ctc aat tta gtt ttc ctt gtc ctt att tta aaa ggt | 48  |
| Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| gtc cag tgt gat gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg cag | 96  |
| Val Gln Cys Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| cct gga ggg tcc cgg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc | 144 |
| Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| agt aac ttt gga atg cac tgg gtt cgt cag gct cca gag aag gga ctg | 192 |
| Ser Asn Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu |     |

189

| pctfr2009051343-seq1 |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| 50                   |                   |                   |                   | 55                |                   |                   |                   | 60                |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |
| gag<br>Glu<br>65     | tgg<br>Trp        | gtc<br>Val        | gca<br>Ala        | tac<br>Tyr        | att<br>Ile<br>70  | agt<br>Ser        | agt<br>Ser        | ggc<br>Gly        | agt<br>Ser        | agt<br>Ser<br>75  | acc<br>Thr        | atc<br>Ile        | tac<br>Tyr        | tat<br>Tyr        | gca<br>Ala<br>80  | 240  |
| gac<br>Asp           | aca<br>Thr        | gtg<br>Val        | aag<br>Lys        | ggc<br>Gly<br>85  | cga<br>Arg        | ttc<br>Phe        | acc<br>Thr        | atc<br>Ile        | tcc<br>Ser<br>90  | aga<br>Arg        | gac<br>Asp        | aat<br>Asn        | ccc<br>Pro        | aag<br>Lys<br>95  | aac<br>Asn        | 288  |
| acc<br>Thr           | ctg<br>Leu        | ttc<br>Phe        | ctg<br>Leu<br>100 | caa<br>Gln        | atg<br>Met        | acc<br>Thr        | agt<br>Ser        | cta<br>Leu<br>105 | agg<br>Arg        | tct<br>Ser        | gag<br>Glu        | gac<br>Asp        | acg<br>Thr<br>110 | gcc<br>Ala        | atg<br>Met        | 336  |
| tat<br>Tyr           | tac<br>Tyr        | tgt<br>Cys<br>115 | gca<br>Ala        | aga<br>Arg        | tat<br>Tyr        | gat<br>Asp        | tac<br>Tyr<br>120 | gac<br>Asp        | gat<br>Asp        | gat<br>Asp        | tac<br>Tyr        | tat<br>Tyr<br>125 | gct<br>Ala        | atg<br>Met        | gaa<br>Glu        | 384  |
| tac<br>Tyr           | tgg<br>Trp<br>130 | ggg<br>Gly        | caa<br>Gln        | gga<br>Gly        | acc<br>Thr        | tca<br>Ser<br>135 | gtc<br>Val        | acc<br>Thr        | gtc<br>Val        | tcc<br>Ser        | tca<br>Ser<br>140 | gcc<br>Ala        | aaa<br>Lys        | acg<br>Thr        | aca<br>Thr        | 432  |
| ccc<br>Pro<br>145    | cca<br>Pro        | tct<br>Ser        | gtc<br>Val        | tat<br>Tyr        | cca<br>Pro<br>150 | ctg<br>Leu        | gcc<br>Ala        | cct<br>Pro        | gga<br>Gly        | tct<br>Ser<br>155 | gct<br>Ala        | gcc<br>Ala        | caa<br>Gln        | act<br>Thr        | aac<br>Asn<br>160 | 480  |
| tcc<br>Ser           | atg<br>Met        | gtg<br>Val        | acc<br>Thr        | ctg<br>Leu<br>165 | gga<br>Gly        | tgc<br>Cys        | ctg<br>Leu        | gtc<br>Val        | aag<br>Lys<br>170 | ggc<br>Gly        | tat<br>Tyr        | ttc<br>Phe        | cct<br>Pro        | gag<br>Glu<br>175 | cca<br>Pro        | 528  |
| gtg<br>Val           | aca<br>Thr        | gtg<br>Val        | acc<br>Thr<br>180 | tgg<br>Trp        | aac<br>Asn        | tct<br>Ser        | gga<br>Gly        | tcc<br>Ser<br>185 | ctg<br>Leu        | tcc<br>Ser        | agc<br>Ser        | ggg<br>Gly        | gtg<br>Val<br>190 | cac<br>His        | acc<br>Thr        | 576  |
| ttc<br>Phe           | cca<br>Pro        | gct<br>Ala<br>195 | gtc<br>Val        | ctg<br>Leu        | cag<br>Gln        | tct<br>Ser        | gac<br>Asp<br>200 | ctc<br>Leu        | tac<br>Tyr        | act<br>Thr        | ctg<br>Leu        | agc<br>Ser<br>205 | agc<br>Ser        | tca<br>Ser        | gtg<br>Val        | 624  |
| act<br>Thr           | gtc<br>Val<br>210 | ccc<br>Pro        | tcc<br>Ser        | agc<br>Ser        | acc<br>Thr        | tgg<br>Trp<br>215 | ccc<br>Pro        | agc<br>Ser        | gag<br>Glu        | acc<br>Thr        | gtc<br>Val<br>220 | acc<br>Thr        | tgc<br>Cys        | aac<br>Asn        | gtt<br>Val        | 672  |
| gcc<br>Ala<br>225    | cac<br>His        | ccg<br>Pro        | gcc<br>Ala        | agc<br>Ser        | agc<br>Ser<br>230 | acc<br>Thr        | aag<br>Lys        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | aag<br>Lys<br>235 | aaa<br>Lys        | att<br>Ile        | gtg<br>Val        | ccc<br>Pro        | agg<br>Arg<br>240 | 720  |
| gat<br>Asp           | tgt<br>Cys        | ggg<br>Gly        | tgt<br>Cys        | aag<br>Lys<br>245 | cct<br>Pro        | tgc<br>Cys        | ata<br>Ile        | tgt<br>Cys        | aca<br>Thr<br>250 | gtc<br>Val        | cca<br>Pro        | gaa<br>Glu        | gta<br>Val        | tca<br>Ser<br>255 | tct<br>Ser        | 768  |
| gtc<br>Val           | ttc<br>Phe        | atc<br>Ile<br>260 | ttc<br>Phe        | ccc<br>Pro        | cca<br>Pro        | aag<br>Lys        | ccc<br>Pro        | aag<br>Lys<br>265 | gat<br>Asp        | gtg<br>Val        | ctc<br>Leu        | acc<br>Thr        | att<br>Ile<br>270 | act<br>Thr        | ctg<br>Leu        | 816  |
| act<br>Thr           | cct<br>Pro        | aag<br>Lys<br>275 | gtc<br>Val        | acg<br>Thr        | tgt<br>Cys        | gtt<br>Val        | gtg<br>Val<br>280 | gta<br>Val        | gac<br>Asp        | atc<br>Ile        | agc<br>Ser        | aag<br>Lys<br>285 | gat<br>Asp        | gat<br>Asp        | ccc<br>Pro        | 864  |
| gag<br>Glu           | gtc<br>Val<br>290 | cag<br>Gln        | ttc<br>Phe        | agc<br>Ser        | tgg<br>Trp        | ttt<br>Phe<br>295 | gta<br>Val        | gat<br>Asp        | gat<br>Asp        | gtg<br>Val        | gag<br>Glu<br>300 | gtg<br>Val        | cac<br>His        | aca<br>Thr        | gct<br>Ala        | 912  |
| cag<br>Gln<br>305    | acg<br>Thr        | caa<br>Gln        | ccc<br>Pro        | cgg<br>Arg        | gag<br>Glu<br>310 | gag<br>Glu        | cag<br>Gln        | ttc<br>Phe        | aac<br>Asn        | agc<br>Ser<br>315 | act<br>Thr        | ttc<br>Phe        | cgc<br>Arg        | tca<br>Ser        | gtc<br>Val<br>320 | 960  |
| agt<br>Ser           | gaa<br>Glu        | ctt<br>Leu        | ccc<br>Pro        | atc<br>Ile<br>325 | atg<br>Met        | cac<br>His        | cag<br>Gln        | gac<br>Asp        | tgg<br>Trp<br>330 | ctc<br>Leu        | aat<br>Asn        | ggc<br>Gly        | aag<br>Lys        | gag<br>Glu<br>335 | ttc<br>Phe        | 1008 |
| aaa<br>Lys           | tgc<br>Cys        | agg<br>Arg        | gtc<br>Val<br>340 | aac<br>Asn        | agt<br>Ser        | gca<br>Ala        | gct<br>Ala        | ttc<br>Phe<br>345 | cct<br>Pro        | gcc<br>Ala        | ccc<br>Pro        | atc<br>Ile        | gag<br>Glu<br>350 | aaa<br>Lys        | acc<br>Thr        | 1056 |
| atc                  | tcc               | aaa               | acc               | aaa               | ggc               | aga               | ccg               | aag               | gct               | cca               | cag               | gtg               | tac               | acc               | att               | 1104 |

Página 10

190

pctfr2009051343-seq1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Ile | Ser | Lys | Thr | Lys | Gly | Arg | Pro | Lys | Ala | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Ile |      |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| cca | cct | ccc | aag | gag | cag | atg | gcc | aag | gat | aaa | gtc | agt | ctg | acc | tgc | 1152 |
| Pro | Pro | Pro | Lys | Glu | Gln | Met | Ala | Lys | Asp | Lys | Val | Ser | Leu | Thr | Cys |      |
|     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |
| atg | ata | aca | gac | ttc | ttc | cct | gaa | gac | att | act | gtg | gag | tgg | cag | tgg | 1200 |
| Met | Ile | Thr | Asp | Phe | Phe | Pro | Glu | Asp | Ile | Thr | Val | Glu | Trp | Gln | Trp |      |
|     |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |      |
| aat | ggg | cag | cca | gcg | gag | aac | tac | aag | aac | act | cag | ccc | atc | atg | gac | 1248 |
| Asn | Gly | Gln | Pro | Ala | Glu | Asn | Tyr | Lys | Asn | Thr | Gln | Pro | Ile | Met | Asp |      |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |      |
| aca | gat | ggc | tct | tac | ttc | gtc | tac | agc | aag | ctc | aat | gtg | cag | aag | agc | 1296 |
| Thr | Asp | Gly | Ser | Tyr | Phe | Val | Tyr | Ser | Lys | Leu | Asn | Val | Gln | Lys | Ser |      |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |      |
| aac | tgg | gag | gca | gga | aat | act | ttc | acc | tgc | tct | gtg | tta | cat | gag | ggc | 1344 |
| Asn | Trp | Glu | Ala | Gly | Asn | Thr | Phe | Thr | Cys | Ser | Val | Leu | His | Glu | Gly |      |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |      |
| ctg | cac | aac | cac | cat | act | gag | aag | agc | ctc | tcc | cac | tct | cct | ggt | aag | 1392 |
| Leu | His | Asn | His | His | Thr | Glu | Lys | Ser | Leu | Ser | His | Ser | Pro | Gly | Lys |      |
|     |     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |      |
| tga |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1395 |

<210> 16  
 <211> 464  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 <400> 16

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

291

pctfr2009051343-seq1

Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro  
165 170 175

Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr  
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val  
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val  
210 215 220

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

Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser  
245 250 255

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu  
260 265 270

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro  
275 280 285

Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala  
290 295 300

Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val  
305 310 315 320

Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe  
325 330 335

Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
340 345 350

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile  
355 360 365

Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys  
370 375 380

Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp  
385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp  
405 410 415

Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser  
420 425 430

Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly  
435 440 445

Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

192

pctfr2009051343-seq1  
460

|                                                                 |            |     |  |     |
|-----------------------------------------------------------------|------------|-----|--|-----|
| 450                                                             |            | 455 |  |     |
| <210>                                                           | 17         |     |  |     |
| <211>                                                           | 705        |     |  |     |
| <212>                                                           | DNA        |     |  |     |
| <213>                                                           | Mus sp.    |     |  |     |
| <220>                                                           |            |     |  |     |
| <221>                                                           | CDS        |     |  |     |
| <222>                                                           | (1)..(705) |     |  |     |
| <400>                                                           | 17         |     |  |     |
| atg gcc tgg att tca ctt ata ctc tct ctc ctg gct ctc agc tca ggg |            |     |  | 48  |
| Met Ala Trp Ile Ser Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Gly |            |     |  |     |
| 1 5 10 15                                                       |            |     |  |     |
| gcc att tcc cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca |            |     |  | 96  |
| Ala Ile Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser |            |     |  |     |
| 20 25 30                                                        |            |     |  |     |
| cct ggt gaa aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt |            |     |  | 144 |
| Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val |            |     |  |     |
| 35 40 45                                                        |            |     |  |     |
| aca act agt aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta |            |     |  | 192 |
| Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu |            |     |  |     |
| 50 55 60                                                        |            |     |  |     |
| ttc act ggt cta ata ggt ggt acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct |            |     |  | 240 |
| Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro |            |     |  |     |
| 65 70 75 80                                                     |            |     |  |     |
| gcc aga ttc tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc |            |     |  | 288 |
| Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile |            |     |  |     |
| 85 90 95                                                        |            |     |  |     |
| aca ggg gca cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg |            |     |  | 336 |
| Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp |            |     |  |     |
| 100 105 110                                                     |            |     |  |     |
| tac agc aac cat tgg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta |            |     |  | 384 |
| Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu |            |     |  |     |
| 115 120 125                                                     |            |     |  |     |
| ggc cag ccc aag tct tcg cca tca gtc acc ctg ttt cca cct tcc tct |            |     |  | 432 |
| Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser |            |     |  |     |
| 130 135 140                                                     |            |     |  |     |
| gaa gag ctc gag act aac aag gcc aca ctg gtg tgt acg atc act gat |            |     |  | 480 |
| Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp |            |     |  |     |
| 145 150 155 160                                                 |            |     |  |     |
| ttc tac cca ggt gtg gtg aca gtg gac tgg aag gta gat ggt acc cct |            |     |  | 528 |
| Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro |            |     |  |     |
| 165 170 175                                                     |            |     |  |     |
| gtc act cag ggt atg gag aca acc cag cct tcc aaa cag agc aac aac |            |     |  | 576 |
| Val Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn |            |     |  |     |
| 180 185 190                                                     |            |     |  |     |
| aag tac atg gct agc agc tac ctg acc ctg aca gca aga gca tgg gaa |            |     |  | 624 |
| Lys Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu |            |     |  |     |
| 195 200 205                                                     |            |     |  |     |
| agg cat agc agt tac agc tgc cag gtc act cat gaa ggt cac act gtg |            |     |  | 672 |
| Arg His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val |            |     |  |     |
| 210 215 220                                                     |            |     |  |     |
| gag aag agt ttg tcc cgt gct gac tgt tcc tag                     |            |     |  | 705 |
| Glu Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser                         |            |     |  |     |
| 225 230                                                         |            |     |  |     |

193

pctfr2009051343-seq1

<210> 18  
<211> 234  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 18

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

<210> 19  
<211> 420  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CDS

194

pctfr2009051343-seq1

<222> (1)..(420)

<400> 19

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| atg | gac | tcc | agg | ctc | aat | tta | gtt | ttc | ctt | gtc | ctt | att | tta | aaa | ggg | 48 |
| Met | Asp | Ser | Arg | Leu | Asn | Leu | Val | Phe | Leu | Val | Leu | Ile | Leu | Lys | Gly |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| gtc | cag | tgt | gat | gtg | cag | ctg | gtg | gag | tct | ggg | gga | ggc | tta | gtg | cag | 96 |
| Val | Gln | Cys | Asp | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln |    |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| cct | gga | ggg | tcc | cgg | aaa | ctc | tcc | tgt | gca | gcc | tct | gga | ttc | act | ttc | 144 |
| Pro | Gly | Gly | Ser | Arg | Lys | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| agt | aac | ttt | gga | atg | cac | tgg | gtt | cgt | cag | gct | cca | gag | aag | gga | ctg | 192 |
| Ser | Asn | Phe | Gly | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Glu | Lys | Gly | Leu |     |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gag | tgg | gtc | gca | tac | att | agt | agt | ggc | agt | agt | acc | atc | tac | tat | gca | 240 |
| Glu | Trp | Val | Ala | Tyr | Ile | Ser | Ser | Gly | Ser | Ser | Thr | Ile | Tyr | Tyr | Ala |     |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gac | aca | gtg | aag | ggc | cga | ttc | acc | atc | tcc | aga | gac | aat | ccc | aag | aac | 288 |
| Asp | Thr | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Pro | Lys | Asn |     |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| acc | ctg | ttc | ctg | caa | atg | acc | agt | cta | agg | tct | gag | gac | acg | gcc | atg | 336 |
| Thr | Leu | Phe | Leu | Gln | Met | Thr | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Met |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| tat | tac | tgt | gca | aga | tat | gat | tac | gac | gat | gat | tac | tat | gct | atg | gaa | 384 |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Tyr | Asp | Tyr | Asp | Asp | Asp | Tyr | Tyr | Ala | Met | Glu |     |
|     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|-----|
| tac | tgg | ggg | caa | gga | acc | tca | gtc | acc | gtc | tcc | tca |  |  |  |  | 420 |
| Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser |  |  |  |  |     |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |  |  |  |  |     |

<210> 20

<211> 140

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 20

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asp | Ser | Arg | Leu | Asn | Leu | Val | Phe | Leu | Val | Leu | Ile | Leu | Lys | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| val | Gln | Cys | Asp | val | Gln | Leu | val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | val | Gln |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Gly | Gly | Ser | Arg | Lys | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Asn | Phe | Gly | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Glu | Lys | Gly | Leu |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Trp | Val | Ala | Tyr | Ile | Ser | Ser | Gly | Ser | Ser | Thr | Ile | Tyr | Tyr | Ala |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Thr | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Pro | Lys | Asn |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Leu | Phe | Leu | Gln | Met | Thr | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Met |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

195

pctfr2009051343-seq1  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Asp Asp Asp Tyr Tyr Ala Met Glu  
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
130 135 140

<210> 21  
<211> 412  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CDS  
<222> (29)..(412)

<400> 21  
tgaaaagaat agacctgggt tgtgaatt atg gcc tgg att tca ctt ata ctc 52  
Met Ala Trp Ile Ser Leu Ile Leu  
1 5  
  
tct ctc ctg gct ctc agc tca ggg gcc att tcc cag gct gtt gtg act 100  
Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Gly Ala Ile Ser Gln Ala Val Val Thr  
10 15 20  
  
cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa aca gtc aca ctc act 148  
Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr  
25 30 35 40  
  
tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act agt aac tat gcc aac tgg 196  
Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp  
45 50 55  
  
gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt cta ata ggt ggt acc 244  
Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr  
60 65 70  
  
aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc tca ggc tcc ctg att 292  
Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile  
75 80 85  
  
gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca cag act gag gat gag 340  
Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu  
90 95 100  
  
gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc aac cat tgg gtg ttc ggt 388  
Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly  
105 110 115 120  
  
gga gga acc aaa ctg act gtc cta 412  
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
125

<210> 22  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 22  
Met Ala Trp Ile Ser Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Gly  
1 5 10 15  
  
Ala Ile Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser  
20 25 30  
  
Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val  
35 40 45

196

pctfr2009051343-seq1

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu  
50 55 60

Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro  
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile  
85 90 95

Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp  
100 105 110

Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
115 120 125

<210> 23  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 23

Asn Phe Gly Met His  
1 5

<210> 24  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 24

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 25  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 25

Tyr Asp Tyr Asp Asp Asp Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr  
1 5 10

<210> 26  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 26

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn  
1 5 10

<210> 27  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 27

19A

pctfr2009051343-seq1

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro  
1 5

<210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 28

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val  
1 5

<210> 29  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> séquence humanisée

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(321)

<400> 29  
cag tct gcc ctg act cag tcc cca gca act ctc tct gtg tct ccc ggc 48  
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
caa tct gtg agc ctg tcc tgt cgg gca agc cag tct att tcc aat tat 96  
Gln Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30  
ctg cac tgg tat cag caa cac cca ggc gag agc cca cgg ctc ctg atc 144  
Leu His Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45  
aaa tac gcc tct caa tcc att tct ggc tcc aac aga cgc ttc tct ggc 192  
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ser Asn Arg Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
agc ggc tcc ggc acc gat ttc att ctc agc ttt aat agc gtt cag gca 240  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Ser Phe Asn Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80  
gag gat ttt ggg atg tac ttc tgt caa cag agc aac tct tgg cct ttt 288  
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe  
85 90 95  
acc ttc gga agc ggg act aaa ctg acc gtt ctg 321  
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 30  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 30

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

199

pctfr2009051343-seq1

Leu His Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45  
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ser Asn Arg Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Ser Phe Asn Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe  
85 90 95  
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 31  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Séquence humanisée

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(321)

<400> 31  
caa tct gca ctg act caa tct cca gca aca ctg tcc gtt tct cct gga 48  
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
caa tcc gtg agc ctc agc tgt agg gca tcc cag tcc att agc aac tat 96  
Gln Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30  
ctc cac tgg tac cag cag cac cca gga gaa agc cct cgc ctg ctg ata 144  
Leu His Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45  
aaa tac gca agc cag tct att agc ggc agc aac cgg cgc ttc agc ggg 192  
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ser Asn Arg Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
tcc ggc tcc ggg aca gac ttt atc ctg tct ttt agc agc gtg caa gcc 240  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Ser Phe Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80  
gaa gac ttt ggc atg tac ttc tgc cag cag tct aac aat tgg cca ttc 288  
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Asn Trp Pro Phe  
85 90 95  
acc ttc gga tcc ggc aca aag ctg acc gtg ctg 321  
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 32  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 32

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
Página 19

1 5 10 15

Gln Ser Val Ser<sub>20</sub> Leu Ser Cys Arg Ala<sub>25</sub> Ser Gln Ser Ile Ser<sub>30</sub> Asn Tyr

Leu His Trp<sub>35</sub> Tyr Gln Gln His Pro<sub>40</sub> Gly Glu Ser Pro Arg<sub>45</sub> Leu Leu Ile

Lys Tyr<sub>50</sub> Ala Ser Gln Ser Ile<sub>55</sub> Ser Gly Ser Asn Arg<sub>60</sub> Arg Phe Ser Gly

Ser<sub>65</sub> Gly Ser Gly Thr Asp<sub>70</sub> Phe Ile Leu Ser Phe<sub>75</sub> Ser Ser Val Gln Ala<sub>80</sub>

Glu Asp Phe Gly Met<sub>85</sub> Tyr Phe Cys Gln Gln<sub>90</sub> Ser Asn Asn Trp Pro<sub>95</sub> Phe

Thr Phe Gly Ser<sub>100</sub> Gly Thr Lys Leu Thr<sub>105</sub> Val Leu

|       |            |
|-------|------------|
| <210> | 33         |
| <211> | 342        |
| <212> | DNA        |
| <213> | Artificial |

<220>  
<223> Séquence humanisée

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(342)

[illegible]

**<210> 34**

pctfr2009051343-seq1

<211> 114  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 34

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Ala Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu

<210> 35  
<211> 342  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Séquence humanisée

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(342)

<400> 35

cag gtg act ctc aaa gaa tct ggc cct aca ctg gtg aaa ccc act cag 48  
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

aca ctc agc ctg acc tgc tcc ttc agc ggc ttc tct ctg agc act tcc 96  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

gga ctc gga gtg agc tgg att cgc caa cct cct ggg aaa ggc ctg gag 144  
Gly Leu Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

tgg ctg gca cac ata tac tgg gat gac gac aaa cgc tat aac cct agc 192  
Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

ctg aag tcc aga ctc aca atc tcc aaa gat aca tcc agc aat cag gtg 240  
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val  
65 70 75 80

200

pctfr2009051343-seq1  
ttt ctg aag atc acc tcc gtc gat cca gtc gac acc gcc act tac tat 288  
Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95  
tgt gct cgc gat tac tat gcc agc tcc ttc gac tac tgg gga cag gga 336  
Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Ala Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
aca ctg 342  
Thr Leu

<210> 36  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 36

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

Gly Leu Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Ala Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu

<210> 37  
<211> 342  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Séquence humanisée

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(342)

<400> 37

cag gtc aca ctc aaa gaa tct gga cca aca ctc gtt aaa cca act caa 48  
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

aca ctc agc ctg act tgc agc ttt tct ggc ttc agc ctc tcc act agc 96  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

201

pctfr2009051343-seq1

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 20                                                              | 25  | 30  |     |
| ggc ctc ggc gtg tcc tgg atc cgg cag ccc cct gga aaa ggc ctg gag |     |     | 144 |
| Gly Leu Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu |     |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |     |
| tgg ctg gcc cac atc tat tgg gac gat gac aag cgg tac aat cca agc |     |     | 192 |
| Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| ctg aaa tct cgg ctg acc ata tct aag gat act tct tcc aat cag gtg |     |     | 240 |
| Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |     |
| ttc ctg aag atc aca tct gtg gct cct gtc gac act gcc act tat tat |     |     | 288 |
| Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Ala Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| tgc gca agg gat tac tac gca tcc tcc ttc gat tac tgg ggc cag gga |     |     | 336 |
| Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Ala Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| act ctg                                                         |     |     | 342 |
| Thr Leu                                                         |     |     |     |

<210> 38  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 38

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

Gly Leu Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Ala Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Ala Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu

<210> 39  
 <211> 1059  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens



233

pctfr2009051343-seq1  
285

|     |                                                                 |      |
|-----|-----------------------------------------------------------------|------|
| 275 | atc aat agc tca gag gtg gag gtc ctg tac ctg cgg aac gtg tca gcc | 912  |
|     | Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu Arg Asn Val Ser Ala |      |
|     | 290 295 300                                                     |      |
|     | gag gac gca ggc gag tac acc tgc ctc gca ggc aat tcc atc ggc ctc | 960  |
|     | Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu |      |
|     | 305 310 315 320                                                 |      |
|     | tcc tac cag tct gcc tgg ctc acg gtg ctg cca gag gag gac ccc aca | 1008 |
|     | Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Glu Glu Asp Pro Thr |      |
|     | 325 330 335                                                     |      |
|     | tgg acc gca gca gcg ccc gag gcc gct agc cat cac cat cat cat cac | 1056 |
|     | Trp Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Ala Ser His His His His His His |      |
|     | 340 345 350                                                     |      |
|     | tga                                                             | 1059 |

<210> 40  
<211> 352  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 40

Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro Cys Leu Ala Pro Ser  
1 5 10 15

Leu Glu Gln Gln Glu Gln Glu Leu Thr Val Ala Leu Gly Gln Pro Val  
20 25 30

Arg Leu Cys Cys Gly Arg Ala Glu Arg Gly Gly His Trp Tyr Lys Glu  
35 40 45

Gly Ser Arg Leu Ala Pro Ala Gly Arg Val Arg Gly Trp Arg Gly Arg  
50 55 60

Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys  
65 70 75 80

Leu Ala Arg Gly Ser Met Ile Val Leu Gln Asn Leu Thr Leu Ile Thr  
85 90 95

Gly Asp Ser Leu Thr Ser Ser Asn Asp Asp Glu Asp Pro Lys Ser His  
100 105 110

Arg Asp Leu Ser Asn Arg His Ser Tyr Pro Gln Gln Ala Pro Tyr Trp  
115 120 125

Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Gly  
130 135 140

Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Thr  
145 150 155 160

Ile Arg Trp Leu Lys Asp Gly Gln Ala Phe His Gly Glu Asn Arg Ile  
165 170 175

Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser Leu Val Met Glu Ser  
180 185 190

204

pctfr2009051343-seq1

Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys Leu Val Glu Asn Ala  
195 200 205

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

Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Thr Thr Ala  
225 230 235 240

Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu Leu Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala  
245 250 255

Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val Ile Asn Gly Ser Ser  
260 265 270

Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val Leu Lys Thr Ala Asp  
275 280 285

Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu Arg Asn Val Ser Ala  
290 295 300

Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu  
305 310 315 320

Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Glu Glu Asp Pro Thr  
325 330 335

Trp Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Ala Ser His His His His His His  
340 345 350

<210> 41  
<211> 726  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(726)

<400> 41  
ctg gag gcc tct gag gaa gtg gag ctt gag ccc tgc caa gca ccc tac 48  
Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro Cys Gln Ala Pro Tyr  
1 5 10 15

tgg aca cac ccc cag cgc atg gag aag aaa ctg cat gca gta cct gcg 96  
Trp Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala  
20 25 30

ggg aac acc gtc aag ttc cgc tgt cca gct gca ggc aac ccc acg ccc 144  
Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro  
35 40 45

acc atc cgc tgg ctt aag gat gga cag gcc ttt cat ggg gag aac cgc 192  
Thr Ile Arg Trp Leu Lys Asp Gly Gln Ala Phe His Gly Glu Asn Arg  
50 55 60

att gga ggc att cgg ctg cgc cat cag cac tgg agt ctc gtg atg gag 240  
Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser Leu Val Met Glu  
65 70 75 80

agc gtg gtg ccc tcg gac cgc ggc aca tac acc tgc ctg gta gag aac 288  
Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys Leu Val Glu Asn  
85 90 95

205

pctfr2009051343-seq1

|                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |     |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|
| gct<br>Ala        | gtg<br>Val        | ggc<br>Gly        | agc<br>Ser<br>100 | atc<br>Ile        | cgt<br>Arg        | tat<br>Tyr        | aac<br>Asn<br>105 | tac<br>Tyr<br>105 | ctg<br>Leu        | cta<br>Leu        | gat<br>Asp        | gtg<br>Val<br>110 | ctg<br>Leu<br>110 | gag<br>Glu        | cgg<br>Arg        | 336 |
| tcc<br>Ser        | ccg<br>Pro        | cac<br>His<br>115 | cgg<br>Arg        | ccc<br>Pro        | atc<br>Ile        | ctg<br>Leu<br>120 | cag<br>Gln<br>120 | gcc<br>Ala        | ggg<br>Gly        | ctc<br>Leu        | ccg<br>Pro        | gcc<br>Ala<br>125 | aac<br>Asn        | acc<br>Thr        | aca<br>Thr        | 384 |
| gcc<br>Ala<br>130 | gtg<br>Val<br>130 | gtg<br>Val        | ggc<br>Gly        | agc<br>Ser        | gac<br>Asp        | gtg<br>Val<br>135 | gag<br>Glu        | ctg<br>Leu        | ctg<br>Leu        | tgc<br>Cys        | aag<br>Lys<br>140 | gtg<br>Val        | tac<br>Tyr        | agc<br>Ser        | gat<br>Asp        | 432 |
| gcc<br>Ala<br>145 | cag<br>Gln        | ccc<br>Pro        | cac<br>His        | atc<br>Ile        | cag<br>Gln<br>150 | tgg<br>Trp        | ctg<br>Leu        | aag<br>Lys        | cac<br>His        | atc<br>Ile<br>155 | gtc<br>Val        | atc<br>Ile        | aac<br>Asn        | ggc<br>Gly        | agc<br>Ser<br>160 | 480 |
| agc<br>Ser        | ttc<br>Phe        | gga<br>Gly        | gcc<br>Ala        | gac<br>Asp<br>165 | ggg<br>Gly        | ttc<br>Phe        | ccc<br>Pro        | tat<br>Tyr        | gtg<br>Val<br>170 | caa<br>Gln        | gtc<br>Val        | cta<br>Leu        | aag<br>Lys        | act<br>Thr<br>175 | gca<br>Ala        | 528 |
| gac<br>Asp        | atc<br>Ile        | aat<br>Asn        | agc<br>Ser<br>180 | tca<br>Ser        | gag<br>Glu        | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | gtc<br>Val<br>185 | ctg<br>Leu        | tac<br>Tyr        | ctg<br>Leu        | cgg<br>Arg        | aac<br>Asn<br>190 | gtg<br>Val        | tca<br>Ser        | 576 |
| gcc<br>Ala        | gag<br>Glu        | gac<br>Asp<br>195 | gca<br>Ala        | ggc<br>Gly        | gag<br>Glu        | tac<br>Tyr        | acc<br>Thr<br>200 | tgc<br>Cys        | ctc<br>Leu        | gca<br>Ala        | ggc<br>Gly        | aat<br>Asn<br>205 | tcc<br>Ser        | atc<br>Ile        | ggc<br>Gly        | 624 |
| ctc<br>Leu        | tcc<br>Ser<br>210 | tac<br>Tyr        | cag<br>Gln        | tct<br>Ser        | gcc<br>Ala        | tgg<br>Trp<br>215 | ctc<br>Leu        | acg<br>Thr        | gtg<br>Val        | ctg<br>Leu        | cca<br>Pro<br>220 | gag<br>Glu        | gag<br>Glu        | gac<br>Asp        | ccc<br>Pro        | 672 |
| aca<br>Thr<br>225 | tgg<br>Trp        | acc<br>Thr        | gca<br>Ala        | gca<br>Ala        | gcg<br>Ala<br>230 | ccc<br>Pro        | gag<br>Glu        | gcc<br>Ala        | gct<br>Ala        | agc<br>Ser<br>235 | cat<br>His        | cac<br>His        | cat<br>His        | cat<br>His        | cat<br>His<br>240 | 720 |
| cac<br>His        | tga<br>His        |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   | 726 |

<210> 42  
<211> 241  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 42

|           |     |           |            |           |           |           |           |            |           |           |           |           |            |           |           |
|-----------|-----|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| Leu<br>1  | Glu | Ala       | Ser        | Glu<br>5  | Glu       | Val       | Glu       | Leu<br>10  | Pro       | Cys       | Gln       | Ala       | Pro<br>15  | Tyr       |           |
| Trp       | Thr | His       | Pro<br>20  | Gln       | Arg       | Met       | Glu       | Lys<br>25  | Lys       | Leu       | His       | Ala       | Val<br>30  | Pro       | Ala       |
| Gly       | Asn | Thr<br>35 | Val        | Lys       | Phe       | Arg       | Cys<br>40 | Pro        | Ala       | Ala       | Gly       | Asn<br>45 | Pro        | Thr       | Pro       |
| Thr<br>50 | Ile | Arg       | Trp        | Leu       | Lys       | Asp<br>55 | Gly       | Gln        | Ala       | Phe       | His<br>60 | Gly       | Glu        | Asn       | Arg       |
| Ile<br>65 | Gly | Gly       | Ile        | Arg       | Leu<br>70 | Arg       | His       | Gln        | His       | Trp<br>75 | Ser       | Leu       | Val        | Met       | Glu<br>80 |
| Ser       | Val | Val       | Pro        | Ser<br>85 | Asp       | Arg       | Gly       | Thr        | Tyr<br>90 | Thr       | Cys       | Leu       | Val        | Glu<br>95 | Asn       |
| Ala       | Val | Gly       | Ser<br>100 | Ile       | Arg       | Tyr       | Asn       | Tyr<br>105 | Leu       | Leu       | Asp       | Val       | Leu<br>110 | Glu       | Arg       |

200

pctfr2009051343-seq1

Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Thr Thr  
115 120 125

Ala Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu Leu Cys Lys Val Tyr Ser Asp  
130 135 140

Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val Ile Asn Gly Ser  
145 150 155 160

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

Asp Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu Arg Asn Val Ser  
180 185 190

Ala Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly  
195 200 205

Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Glu Glu Asp Pro  
210 215 220

Thr Trp Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Ala Ser His His His His His  
225 230 235 240

His

<210> 43  
<211> 1059  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1059)

<400> 43  
ctt gag gcc tct gag gaa atg gag cag gag ccc tgc cta gcc cca atc 48  
Leu Glu Ala Ser Glu Glu Met Glu Gln Glu Pro Cys Leu Ala Pro Ile  
1 5 10 15

ctg gag cag caa gag cag gtg ttg acg gtg gcc ctg ggg cag cct gtg 96  
Leu Glu Gln Gln Glu Gln Val Leu Thr Val Ala Leu Gly Gln Pro Val  
20 25 30

agg ctg tgc tgt ggg cgc acc gag cgt ggt cgt cac tgg tac aaa gag 144  
Arg Leu Cys Cys Gly Arg Thr Glu Arg Gly Arg His Trp Tyr Lys Glu  
35 40 45

ggc agc cgc cta gca tct gct ggg cga gta cgg ggt tgg aga ggc cgc 192  
Gly Ser Arg Leu Ala Ser Ala Gly Arg Val Arg Gly Trp Arg Gly Arg  
50 55 60

ctg gag atc gcc agc ttc ctt cct gag gat gct ggc cga tac ctc tgc 240  
Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys  
65 70 75 80

ctg gcc cgt ggc tcc atg acc gtc gta cac aat ctt acg ttg ctt atg 288  
Leu Ala Arg Gly Ser Met Thr Val Val His Asn Leu Thr Leu Leu Met  
85 90 95

gat gac tcc tta acc tcc atc agt aat gat gaa gac ccc aag aca ctc 336  
Asp Asp Ser Leu Thr Ser Ile Ser Asn Asp Glu Asp Pro Lys Thr Leu

207

pctfr2009051343-seq1  
105

| 100               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   | 105  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 110 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| agc<br>Ser        | agc<br>Ser        | tcc<br>Ser<br>115 | tcg<br>Ser        | agt<br>Ser        | ggg<br>Gly        | cat<br>His        | gtc<br>Val<br>120 | tac<br>Tyr        | cca<br>Pro        | cag<br>Gln        | caa<br>Gln        | gca<br>Ala<br>125 | ccc<br>Pro        | tac<br>Tyr        | tgg<br>Trp        | 384  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| aca<br>Thr        | cac<br>His<br>130 | ccc<br>Pro        | caa<br>Gln        | cgc<br>Arg        | atg<br>Met        | gag<br>Glu<br>135 | aag<br>Lys        | aaa<br>Lys        | ctg<br>Leu        | cat<br>His        | gca<br>Ala<br>140 | gtg<br>Val        | cct<br>Pro        | gcc<br>Ala        | ggg<br>Gly        | 432  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| aat<br>Asn<br>145 | act<br>Thr        | gtc<br>Val        | aaa<br>Lys        | ttc<br>Phe        | cgc<br>Arg<br>150 | tgt<br>Cys        | cca<br>Pro        | gct<br>Ala        | gca<br>Ala        | ggg<br>Gly<br>155 | aac<br>Asn        | ccc<br>Pro        | atg<br>Met        | cct<br>Pro        | acc<br>Thr<br>160 | 480  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| atc<br>Ile        | cac<br>His        | tgg<br>Trp        | ctc<br>Leu        | aag<br>Lys<br>165 | gat<br>Asp        | gga<br>Gly        | cag<br>Gln        | gcc<br>Ala        | ttc<br>Phe<br>170 | cac<br>His        | ggg<br>Gly        | gag<br>Glu        | aat<br>Asn        | cgt<br>Arg<br>175 | att<br>Ile        | 528  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| gga<br>Gly        | ggc<br>Gly        | att<br>Ile        | cgg<br>Arg<br>180 | ctg<br>Leu        | cgc<br>Arg        | cac<br>His        | caa<br>Gln        | cac<br>His<br>185 | tgg<br>Trp        | agc<br>Ser        | ctg<br>Leu        | gtg<br>Val        | atg<br>Met<br>190 | gaa<br>Glu        | agt<br>Ser        | 576  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| gtg<br>Val        | gta<br>Val        | ccc<br>Pro<br>195 | tcg<br>Ser        | gac<br>Asp        | cgt<br>Arg        | ggc<br>Gly        | aca<br>Thr<br>200 | tac<br>Tyr        | aca<br>Thr        | tgc<br>Cys        | ctt<br>Leu        | gtg<br>Val<br>205 | gag<br>Glu        | aac<br>Asn        | tct<br>Ser        | 624  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ctg<br>Leu        | ggg<br>Gly<br>210 | agc<br>Ser        | att<br>Ile        | cgc<br>Arg        | tac<br>Tyr        | agc<br>Ser<br>215 | tat<br>Tyr        | ctc<br>Leu        | ctg<br>Leu        | gat<br>Asp        | gtg<br>Val<br>220 | ctg<br>Leu        | gag<br>Glu        | cgg<br>Arg        | tcc<br>Ser        | 672  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ccg<br>Pro<br>225 | cac<br>His        | cgg<br>Arg        | ccc<br>Pro        | atc<br>Ile        | ctg<br>Leu<br>230 | cag<br>Gln        | gcg<br>Ala        | ggg<br>Gly        | ctc<br>Leu        | cca<br>Pro<br>235 | gcc<br>Ala        | aac<br>Asn        | acc<br>Thr        | aca<br>Thr        | gct<br>Ala<br>240 | 720  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | ggc<br>Gly        | agc<br>Ser        | gac<br>Asp<br>245 | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | cta<br>Leu        | ctc<br>Leu        | tgc<br>Cys<br>250 | aag<br>Lys        | gtg<br>Val        | tac<br>Tyr        | agc<br>Ser        | gac<br>Asp<br>255 | gcc<br>Ala        | 768  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| cag<br>Gln        | ccc<br>Pro        | cac<br>His        | ata<br>Ile<br>260 | cag<br>Gln        | tgg<br>Trp        | ctg<br>Leu        | aaa<br>Lys        | cac<br>His<br>265 | gtc<br>Val        | gtc<br>Val        | atc<br>Ile        | aac<br>Asn        | ggc<br>Gly<br>270 | agc<br>Ser        | agc<br>Ser        | 816  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ttc<br>Phe        | ggc<br>Gly        | gcc<br>Ala<br>275 | gac<br>Asp        | ggg<br>Gly        | ttc<br>Phe        | ccc<br>Pro        | tac<br>Tyr<br>280 | gta<br>Val        | caa<br>Gln        | gtc<br>Val        | ctg<br>Leu        | aag<br>Lys<br>285 | aca<br>Thr        | aca<br>Thr        | gac<br>Asp        | 864  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| atc<br>Ile        | aat<br>Asn<br>290 | agc<br>Ser        | tcg<br>Ser        | gag<br>Glu        | gta<br>Val        | gag<br>Glu<br>295 | gtc<br>Val        | ttg<br>Leu        | tat<br>Tyr        | ctg<br>Leu        | agg<br>Arg<br>300 | aac<br>Asn        | gtg<br>Val        | tcc<br>Ser        | gct<br>Ala        | 912  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| gag<br>Glu<br>305 | gat<br>Asp        | gca<br>Ala        | gga<br>Gly        | gag<br>Glu        | tat<br>Tyr<br>310 | acc<br>Thr        | tgt<br>Cys        | ctg<br>Leu        | gcg<br>Ala        | ggc<br>Gly<br>315 | aac<br>Asn        | tcc<br>Ser        | atc<br>Ile        | ggc<br>Gly        | ctt<br>Leu<br>320 | 960  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| tcc<br>Ser        | tac<br>Tyr        | cag<br>Gln        | tca<br>Ser        | gcg<br>Ala<br>325 | tgg<br>Trp        | ctc<br>Leu        | acg<br>Thr        | gtg<br>Val        | ctg<br>Leu<br>330 | cca<br>Pro        | gag<br>Glu        | gaa<br>Glu        | gac<br>Asp        | ctc<br>Leu<br>335 | acg<br>Thr        | 1008 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| tgg<br>Trp        | aca<br>Thr        | aca<br>Thr        | gca<br>Ala<br>340 | acc<br>Thr        | cct<br>Pro        | gag<br>Glu        | gcc<br>Ala        | gct<br>Ala<br>345 | agc<br>Ser        | cat<br>His        | cac<br>His        | cat<br>His        | cat<br>His<br>350 | cat<br>His        | cac<br>His        | 1056 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| tga               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      | 1059 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

<210> 44  
<211> 352  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 44

Leu Glu Ala Ser Glu Glu Met Glu Gln Glu Pro Cys Leu Ala Pro Ile  
1 5 10 15

## pctfr2009051343-seq1

Leu Glu Gln Gln Glu Gln Val Leu Thr Val Ala Leu Gly Gln Pro Val  
 20 25 30  
 Arg Leu Cys Cys Gly Arg Thr Glu Arg Gly Arg His Trp Tyr Lys Glu  
 35 40 45  
 Gly Ser Arg Leu Ala Ser Ala Gly Arg Val Arg Gly Trp Arg Gly Arg  
 50 55 60  
 Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Arg Gly Ser Met Thr Val Val His Asn Leu Thr Leu Leu Met  
 85 90 95  
 Asp Asp Ser Leu Thr Ser Ile Ser Asn Asp Glu Asp Pro Lys Thr Leu  
 100 105 110  
 Ser Ser Ser Ser Ser Gly His Val Tyr Pro Gln Gln Ala Pro Tyr Trp  
 115 120 125  
 Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Gly  
 130 135 140  
 Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Met Pro Thr  
 145 150 155 160  
 Ile His Trp Leu Lys Asp Gly Gln Ala Phe His Gly Glu Asn Arg Ile  
 165 170 175  
 Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser Leu Val Met Glu Ser  
 180 185 190  
 Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys Leu Val Glu Asn Ser  
 195 200 205  
 Leu Gly Ser Ile Arg Tyr Ser Tyr Leu Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser  
 210 215 220  
 Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Thr Thr Ala  
 225 230 235 240  
 Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu Leu Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala  
 245 250 255  
 Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Val Ile Asn Gly Ser Ser  
 260 265 270  
 Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val Leu Lys Thr Thr Asp  
 275 280 285  
 Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu Arg Asn Val Ser Ala  
 290 295 300  
 Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu  
 305 310 315 320

209

pctfr2009051343-seq1

Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Glu Glu Asp Leu Thr  
325 330 335

Trp Thr Thr Ala Thr Pro Glu Ala Ala Ser His His His His His His  
340 345 350

<210> 45  
<211> 1773  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1773)

<400> 45  
agg ccg tcc ccg acc ttg cct gaa caa gcc cag ccc tgg gga gcc cct 48  
Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln Pro Trp Gly Ala Pro  
1 5 10 15

gtg gaa gtg gag tcc ttc ctg gtc cac ccc ggt gac ctg ctg cag ctt 96  
Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly Asp Leu Leu Gln Leu  
20 25 30

cgc tgt cgg ctg cgg gac gat gtg cag agc atc aac tgg ctg cgg gac 144  
Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile Asn Trp Leu Arg Asp  
35 40 45

ggg gtg cag ctg gcg gaa agc aac cgc acc cgc atc aca ggg gag gag 192  
Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg Ile Thr Gly Glu Glu  
50 55 60

gtg gag gtg cag gac tcc gtg ccc gca gac tcc ggc ctc tat gct tgc 240  
Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys  
65 70 75 80

gta acc agc agc ccc tcg ggc agt gac acc acc tac ttc tcc gtc aat 288  
Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Phe Ser Val Asn  
85 90 95

gtt tca gat gct ctc ccc tcc tcg gag gat gat gat gat gat gat gac 336  
Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp  
100 105 110

tcc tct tca gag gag aaa gaa aca gat aac acc aaa cca aac cgt atg 384  
Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Arg Met  
115 120 125

ccc gta gct cca tat tgg aca tcc cca gaa aag atg gaa aag aaa ttg 432  
Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu  
130 135 140

cat gca gtg ccg gct gcc aag aca gtg aag ttc aaa tgc cct tcc agt 480  
His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser  
145 150 155 160

ggg acc cca aac ccc aca ctg cgc tgg ttg aaa aat ggc aaa gaa ttc 528  
Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe  
165 170 175

aaa cct gac cac aga att gga ggc tac aag gtc cgt tat gcc acc tgg 576  
Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp  
180 185 190

agc atc ata atg gac tct gtg gtg ccc tct gac aag ggc aac tac acc 624  
Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr  
195 200 205

tgc att gtg gag aat gag tac ggc agc atc aac cac aca tac cag ctg 672  
Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu

250

pctfr2009051343-seq1

| 210               | 215               | 220               |                   |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| gat<br>Asp<br>225 | gtc<br>Val        | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        |
| cgg<br>Arg        | tcc<br>Ser<br>230 | cct<br>Pro        | cac<br>His        |
| cgg<br>Arg        | ccc<br>Pro        | atc<br>Ile<br>235 | ctg<br>Leu        |
| caa<br>Gln        | gca<br>Ala        | ggg<br>Gly        | ttg<br>Leu<br>240 |
| 720               |                   |                   |                   |
| ccc<br>Pro        | gcc<br>Ala        | aac<br>Asn        | aaa<br>Lys        |
| aca<br>Thr<br>245 | gtg<br>Val        | gcc<br>Ala        | ctg<br>Leu        |
| ggt<br>Gly        | agc<br>Ser<br>250 | aac<br>Asn        | gtg<br>Val        |
| gag<br>Glu        | ttc<br>Phe        | atg<br>Met<br>255 | tgt<br>Cys        |
| 768               |                   |                   |                   |
| aag<br>Lys        | gtg<br>Val        | tac<br>Tyr        | agt<br>Ser<br>260 |
| gac<br>Asp        | ccg<br>Pro        | cag<br>Gln        | ccg<br>Pro        |
| cac<br>His<br>265 | atc<br>Ile        | cag<br>Gln        | tgg<br>Trp        |
| cta<br>Leu        | aag<br>Lys<br>270 | cac<br>His        | atc<br>Ile        |
| 816               |                   |                   |                   |
| gag<br>Glu        | gtg<br>Val        | aat<br>Asn<br>275 | ggg<br>Gly        |
| agc<br>Ser        | aag<br>Lys        | att<br>Ile        | ggc<br>Gly<br>280 |
| cca<br>Pro        | gac<br>Asp        | aac<br>Asn        | ctg<br>Leu        |
| cct<br>Pro<br>285 | tat<br>Tyr        | gtc<br>Val        | cag<br>Gln        |
| 864               |                   |                   |                   |
| atc<br>Ile<br>290 | ttg<br>Leu        | aag<br>Lys        | act<br>Thr        |
| gct<br>Ala        | gga<br>Gly        | gtt<br>Val<br>295 | aat<br>Asn        |
| acc<br>Thr        | acc<br>Thr        | gac<br>Asp        | aaa<br>Lys<br>300 |
| gag<br>Glu        | atg<br>Met        | gag<br>Glu        | gtg<br>Val        |
| 912               |                   |                   |                   |
| ctt<br>Leu<br>305 | cac<br>His        | tta<br>Leu        | aga<br>Arg        |
| aat<br>Asn        | gtc<br>Val<br>310 | tcc<br>Ser        | ttt<br>Phe        |
| gag<br>Glu        | gac<br>Asp        | gca<br>Ala<br>315 | ggg<br>Gly        |
| gag<br>Glu        | tat<br>Tyr        | acg<br>Thr        | tgc<br>Cys<br>320 |
| 960               |                   |                   |                   |
| ttg<br>Leu        | gcg<br>Ala        | ggt<br>Gly        | aac<br>Asn        |
| tct<br>Ser<br>325 | atc<br>Ile        | gga<br>Gly        | ctc<br>Leu        |
| tcc<br>Ser        | cat<br>His<br>330 | cac<br>His        | tct<br>Ser        |
| gca<br>Ala        | tgg<br>Trp        | ttg<br>Leu<br>335 | acc<br>Thr        |
| 1008              |                   |                   |                   |
| gtt<br>Val        | ctg<br>Leu        | gaa<br>Glu        | gcc<br>Ala<br>340 |
| ctg<br>Leu        | gag<br>Glu        | agg<br>Arg        | ccg<br>Pro<br>345 |
| gca<br>Ala        | gtg<br>Val        | atg<br>Met        | acc<br>Thr<br>350 |
| tcg<br>Ser<br>355 | ccc<br>Pro        | ctg<br>Leu        | gtc<br>Val        |
| 1056              |                   |                   |                   |
| tac<br>Tyr        | ctg<br>Leu        | gag<br>Glu        | ata<br>Ile        |
| gcg<br>Ala        | cta<br>Leu        | gag<br>Glu        | ccc<br>Pro<br>360 |
| aaa<br>Lys        | tct<br>Ser        | tgt<br>Cys        | gac<br>Asp<br>365 |
| act<br>Thr        | cac<br>His        | aca<br>Thr        |                   |
| 1104              |                   |                   |                   |
| tgc<br>Cys        | cca<br>Pro<br>370 | ccg<br>Pro        | tgc<br>Cys        |
| cca<br>Pro        | gca<br>Ala        | cct<br>Pro<br>375 | gaa<br>Glu        |
| ctc<br>Leu        | ctg<br>Leu        | ggg<br>Gly        | gga<br>Gly<br>380 |
| ccg<br>Pro        | tca<br>Ser        | gtc<br>Val        | ttc<br>Phe        |
| 1152              |                   |                   |                   |
| ctc<br>Leu<br>385 | ttc<br>Phe        | ccc<br>Pro        | cca<br>Pro        |
| aaa<br>Lys        | ccc<br>Pro<br>390 | aag<br>Lys        | gac<br>Asp        |
| acc<br>Thr        | ctc<br>Leu        | atg<br>Met<br>395 | atc<br>Ile        |
| tcc<br>Ser        | cgg<br>Arg        | acc<br>Thr        | cct<br>Pro<br>400 |
| 1200              |                   |                   |                   |
| gag<br>Glu        | gtc<br>Val        | aca<br>Thr        | tgc<br>Cys        |
| gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        |
| gag<br>Val        | agc<br>Ser<br>410 | cac<br>His        | gaa<br>Glu        |
| gac<br>Asp        | cct<br>Pro        | gag<br>Glu        | gtc<br>Val<br>415 |
| 1248              |                   |                   |                   |
| aag<br>Lys        | ttc<br>Phe        | aac<br>Asn        | tgg<br>Trp<br>420 |
| tac<br>Tyr        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | ggc<br>Gly        |
| gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | gtg<br>Val        | cat<br>His        |
| aat<br>Asn        | gcc<br>Ala<br>430 | aag<br>Lys        | aca<br>Thr        |
| 1296              |                   |                   |                   |
| aag<br>Lys        | ccg<br>Pro        | cgg<br>Arg        | gag<br>Glu        |
| gag<br>Glu        | cag<br>Gln        | tac<br>Tyr        | aac<br>Asn<br>440 |
| agc<br>Ser        | acg<br>Thr        | tac<br>Tyr        | cgt<br>Arg        |
| gtg<br>Val        | gtc<br>Val        | agc<br>Ser        | gtc<br>Val        |
| 1344              |                   |                   |                   |
| ctc<br>Leu        | acc<br>Thr        | gtc<br>Val        | ctg<br>Leu        |
| cac<br>His        | cag<br>Gln        | gac<br>Asp<br>455 | tgg<br>Trp        |
| ctg<br>Leu        | aat<br>Asn        | ggc<br>Gly        | aag<br>Lys<br>460 |
| gag<br>Glu        | tac<br>Tyr        | aag<br>Lys        | tgc<br>Cys        |
| 1392              |                   |                   |                   |
| aag<br>Lys<br>465 | gtc<br>Val        | tcc<br>Ser        | aac<br>Asn        |
| aaa<br>Lys        | gcc<br>Ala<br>470 | ctc<br>Leu        | cca<br>Pro        |
| gcc<br>Ala        | ccc<br>Pro        | cga<br>Arg        | gaa<br>Glu        |
| cca<br>Pro        | cag<br>Gln<br>490 | gtg<br>Val        | tac<br>Tyr        |
| acc<br>Thr        | ctg<br>Leu        | ccc<br>Pro        | cca<br>Pro        |
| 1488              |                   |                   |                   |
| tcc<br>Ser        | cgg<br>Arg        | gat<br>Asp        | gag<br>Glu        |
| ctg<br>Leu        | acc<br>Thr        | aag<br>Lys        | aac<br>Asn        |
| cag<br>Gln<br>505 | gtc<br>Val        | agc<br>Ser        | ctg<br>Leu        |
| acc<br>Thr        | tgc<br>Cys<br>510 | ctg<br>Leu        | gtc<br>Val        |
| 1536              |                   |                   |                   |
| aaa<br>Lys        | ggc<br>Ala        | ttc<br>Ser        | tat<br>Tyr        |
| ccc<br>Pro        | agc<br>Ser        | gac<br>Asp        | atc<br>Ile        |
| gcc<br>Ala        | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | tgg<br>Trp        |
| gag<br>Glu        | agc<br>Ser        | aat<br>Asn        | ggg<br>Gly        |
| 1584              |                   |                   |                   |

pctfr2009051343-seq1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly |      |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |      |
| cag | ccg | gag | aac | aac | tac | aag | acc | acg | cct | ccc | gtg | ctg | gac | tcc | gac | 1632 |
| Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp |      |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |      |
| ggc | tcc | ttc | ttc | ctc | tac | agc | aag | ctc | acc | gtg | gac | aag | agc | agg | tgg | 1680 |
| Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp |      |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |      |
| cag | cag | ggg | aac | gtc | ttc | tca | tgc | tcc | gtg | atg | cat | gag | gct | ctg | cac | 1728 |
| Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His |      |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |      |
| aac | cac | tac | acg | cag | aag | agc | ctc | tcc | ctg | tct | ccg | ggt | aaa | tga |     | 1773 |
| Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     |     |      |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |      |

<210> 46  
 <211> 590  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 46

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

22

pctfr2009051343-seq1  
 Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr  
 195 200 205  
 Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu  
 210 215 220  
 Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu  
 225 230 235 240  
 Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys  
 245 250 255  
 Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile  
 260 265 270  
 Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr Val Gln  
 275 280 285  
 Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Met Glu Val  
 290 295 300  
 Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys  
 305 310 315 320  
 Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr  
 325 330 335  
 Val Leu Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val Met Thr Ser Pro Leu  
 340 345 350  
 Tyr Leu Glu Ile Ala Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 355 360 365  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 370 375 380  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 385 390 395 400  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 405 410 415  
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 420 425 430  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 435 440 445  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 450 455 460  
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 465 470 475 480  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 485 490 495

pctfr2009051343-seq1

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
500 505 510

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
515 520 525

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
530 535 540

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
545 550 555 560

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
565 570 575

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
580 585 590

<210> 47  
<211> 1773  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1773)

<400> 47  
cgg ccc tcc ttc agt tta gtt gag gat acc aca tta gag cca gaa gag 48  
Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu  
1 5 10 15

cca cca acc aaa tac caa atc tct caa cca gaa gtg tac gtg gct gca 96  
Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala  
20 25 30

cca ggg gag tcg cta gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat gcc gcc gtg 144  
Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val  
35 40 45

atc agt tgg act aag gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac aat agg aca 192  
Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr  
50 55 60

gtg ctt att ggg gag tac ttg cag ata aag ggc gcc acg cct aga gac 240  
Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp  
65 70 75 80

tcc ggc ctc tat gct tgt act gcc agt agg act gta gac agt gaa act 288  
Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr  
85 90 95

tgg tac ttc atg gtg aat gtc aca gat gcc atc tca tcc gga gat gat 336  
Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp  
100 105 110

gag gat gac acc gat ggt gcg gaa gat ttt gtc agt gag aac agt aac 384  
Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn  
115 120 125

aac aag aga gca cca tac tgg acc aac aca gaa aag atg gaa aag cgg 432  
Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg  
130 135 140

ctc cat gct gtg cct gcg gcc aac act gtc aag ttt cgc tgc cca gcc 480  
Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala  
145 150 155 160

214

## pctfr2009051343-seq1

|                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| ggg<br>Gly        | ggg<br>Gly        | aac<br>Asn        | cca<br>Pro        | atg<br>Met<br>165 | cca<br>Pro        | acc<br>Thr        | atg<br>Met        | cgg<br>Arg        | tgg<br>Trp<br>170 | ctg<br>Leu        | aaa<br>Lys        | aac<br>Asn        | ggg<br>Gly        | aag<br>Lys<br>175 | gag<br>Glu        | 528  |
| ttt<br>Phe        | aag<br>Lys        | cag<br>Gln        | gag<br>Glu<br>180 | cat<br>His        | cgc<br>Arg        | att<br>Ile        | gga<br>Gly        | ggc<br>Gly<br>185 | tac<br>Tyr        | aag<br>Lys        | gta<br>Val        | cga<br>Arg        | aac<br>Asn<br>190 | cag<br>Gln        | cac<br>His        | 576  |
| tgg<br>Trp        | agc<br>Ser        | ctc<br>Leu<br>195 | att<br>Ile        | atg<br>Met        | gaa<br>Glu        | agt<br>Ser        | gtg<br>Val<br>200 | gtc<br>Val        | cca<br>Pro        | tct<br>Ser        | gac<br>Asp        | aag<br>Lys<br>205 | gga<br>Gly        | aat<br>Asn        | tat<br>Tyr        | 624  |
| acc<br>Thr        | tgt<br>Cys<br>210 | gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | aat<br>Asn        | gaa<br>Glu<br>215 | tac<br>Tyr        | ggg<br>Gly        | tcc<br>Ser        | atc<br>Ile        | aat<br>Asn<br>220 | cac<br>His        | acg<br>Thr        | tac<br>Tyr        | cac<br>His        | 672  |
| ctg<br>Leu<br>225 | gat<br>Asp        | gtt<br>Val        | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | cga<br>Arg<br>230 | tcg<br>Ser        | cct<br>Pro        | cac<br>His        | cgg<br>Arg        | ccc<br>Pro<br>235 | atc<br>Ile        | ctc<br>Leu        | caa<br>Gln        | gcc<br>Ala        | gga<br>Gly<br>240 | 720  |
| ctg<br>Leu        | ccg<br>Pro        | gca<br>Ala        | aat<br>Asn        | gcc<br>Ala<br>245 | tcc<br>Ser        | aca<br>Thr        | gtg<br>Val        | gtc<br>Val        | gga<br>Gly<br>250 | gga<br>Gly        | gac<br>Asp        | gta<br>Val        | gag<br>Glu        | ttt<br>Phe<br>255 | gtc<br>Val        | 768  |
| tgc<br>Cys        | aag<br>Lys        | gtt<br>Val        | tac<br>Tyr<br>260 | agt<br>Ser        | gat<br>Asp        | gcc<br>Ala        | cag<br>Gln        | ccc<br>Pro<br>265 | cac<br>His        | atc<br>Ile        | cag<br>Gln        | tgg<br>Trp        | atc<br>Ile<br>270 | aag<br>Lys        | cac<br>His        | 816  |
| gtg<br>Val        | gaa<br>Glu        | aag<br>Lys<br>275 | aac<br>Asn        | ggc<br>Gly        | agt<br>Ser        | aaa<br>Lys        | tac<br>Tyr<br>280 | ggg<br>Gly        | ccc<br>Pro        | gac<br>Asp        | ggg<br>Gly        | ctg<br>Leu<br>285 | ccc<br>Pro        | tac<br>Tyr        | ctc<br>Leu        | 864  |
| aag<br>Lys        | gtt<br>Val<br>290 | ctc<br>Leu        | aag<br>Lys        | gcc<br>Ala        | gcc<br>Ala        | ggt<br>Gly<br>295 | gtt<br>Val        | aac<br>Asn        | acc<br>Thr        | acg<br>Thr        | gac<br>Asp<br>300 | aaa<br>Lys        | gag<br>Glu        | att<br>Ile        | gag<br>Glu        | 912  |
| gtt<br>Val<br>305 | ctc<br>Leu        | tat<br>Tyr        | att<br>Ile        | cgg<br>Arg        | aat<br>Asn<br>310 | gta<br>Val        | act<br>Thr        | ttt<br>Phe        | gag<br>Glu        | gac<br>Asp<br>315 | gct<br>Ala        | ggg<br>Gly        | gaa<br>Glu        | tat<br>Tyr        | acg<br>Thr<br>320 | 960  |
| tgc<br>Cys        | ttg<br>Leu        | gcg<br>Ala        | ggt<br>Gly        | aat<br>Asn<br>325 | tct<br>Ser        | att<br>Ile        | ggg<br>Gly        | ata<br>Ile        | tcc<br>Ser<br>330 | ttt<br>Phe        | cac<br>His        | tct<br>Ser        | gca<br>Ala        | tgg<br>Trp<br>335 | ttg<br>Leu        | 1008 |
| aca<br>Thr        | gtt<br>Val        | ctg<br>Leu        | cca<br>Pro<br>340 | gcg<br>Ala        | cct<br>Pro        | gga<br>Gly        | aga<br>Arg        | gaa<br>Glu<br>345 | aag<br>Lys        | gag<br>Glu        | att<br>Ile        | aca<br>Thr        | gct<br>Ala<br>350 | tcc<br>Ser        | cca<br>Pro        | 1056 |
| gac<br>Asp        | tac<br>Tyr        | ctg<br>Leu<br>355 | tca<br>Ser        | gcg<br>Ala        | cta<br>Leu        | gag<br>Glu        | ccc<br>Pro<br>360 | aaa<br>Lys        | tct<br>Ser        | tgt<br>Cys        | gac<br>Asp        | aaa<br>Lys<br>365 | act<br>Thr        | cac<br>His        | aca<br>Thr        | 1104 |
| tgc<br>Cys        | cca<br>Pro<br>370 | ccg<br>Pro        | tgc<br>Cys        | cca<br>Pro        | gca<br>Ala        | cct<br>Pro<br>375 | gaa<br>Glu        | ctc<br>Leu        | ctg<br>Leu        | ggg<br>Gly        | gga<br>Gly<br>380 | ccg<br>Pro        | tca<br>Ser        | gtc<br>Val        | ttc<br>Phe        | 1152 |
| ctc<br>Leu<br>385 | ttc<br>Phe        | ccc<br>Pro        | cca<br>Pro        | aaa<br>Lys        | ccc<br>Pro<br>390 | aag<br>Lys        | gac<br>Asp        | acc<br>Thr        | ctc<br>Leu        | atg<br>Met<br>395 | atc<br>Ile        | tcc<br>Ser        | cgg<br>Arg        | acc<br>Thr        | cct<br>Pro<br>400 | 1200 |
| gag<br>Glu        | gtc<br>Val        | aca<br>Thr        | tgc<br>Cys        | gtg<br>Val<br>405 | gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | gtg<br>Val        | agc<br>Ser<br>410 | cac<br>His        | gaa<br>Glu        | gac<br>Asp        | cct<br>Pro        | gag<br>Glu<br>415 | gtc<br>Val        | 1248 |
| aag<br>Lys        | ttc<br>Phe        | aac<br>Asn        | tgg<br>Trp<br>420 | tac<br>Tyr        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | ggc<br>Gly        | gtg<br>Val<br>425 | gag<br>Glu        | gtg<br>Val        | cat<br>His        | aat<br>Asn        | gcc<br>Ala<br>430 | aag<br>Lys        | aca<br>Thr        | 1296 |
| aag<br>Lys        | ccg<br>Pro        | cgg<br>Arg<br>435 | gag<br>Glu        | gag<br>Glu        | cag<br>Gln        | tac<br>Tyr        | aac<br>Asn<br>440 | agc<br>Ser        | acg<br>Thr        | tac<br>Tyr        | cgt<br>Arg        | gtg<br>Val<br>445 | gtc<br>Val        | agc<br>Ser        | gtc<br>Val        | 1344 |
| ctc<br>Leu        | acc<br>Thr        | gtc<br>Val        | ctg<br>Leu        | cac<br>His        | cag<br>Gln        | gac<br>Asp        | tgg<br>Trp        | ctg<br>Leu        | aat<br>Asn        | ggc<br>Gly        | aag<br>Lys        | gag<br>Glu        | tac<br>Tyr        | aag<br>Lys        | tgc<br>Cys        | 1392 |

pctfr2009051343-seq1  
460

|       |              |
|-------|--------------|
| <210> | 48           |
| <211> | 590          |
| <212> | PRT          |
| <213> | Homo sapiens |

Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu  
1 5 10 15

Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala  
20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val  
35 40 45

Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr  
50 55 60

Val<sup>65</sup> Leu Ile Gly Glu Tyr<sup>70</sup> Leu Gln Ile Lys Gly<sup>75</sup> Ala Thr Pro Arg Asp<sup>80</sup>

Ser Gly Leu Tyr **Ala** Cys Thr Ala Ser **Arg** Thr Val Asp Ser **Glu** Thr  
85 90 95

Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp  
100 105 110

Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn  
115 120 125

Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg  
Página 37

216

pctfr2009051343-seq1  
140

130

135

Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala  
145 150 155 160

Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu  
165 170 175

Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His  
180 185 190

Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr  
195 200 205

Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His  
210 215 220

Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly  
225 230 235 240

Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val  
245 250 255

Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His  
260 265 270

Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu  
275 280 285

Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu  
290 295 300

Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr  
305 310 315 320

Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu  
325 330 335

Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro  
340 345 350

Asp Tyr Leu Ser Ala Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
355 360 365

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
370 375 380

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
385 390 395 400

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
405 410 415

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
420 425 430

217

pctfr2009051343-seq1  
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
435 440 445

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
450 455 460

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
465 470 475 480

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
485 490 495

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
500 505 510

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
515 520 525

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
530 535 540

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
545 550 555 560

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
565 570 575

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
580 585 590

<210> 49  
<211> 2403  
<212> DNA  
<213> Rattus sp.

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(2403)

<400> 49  
atg tgg ctg ctg ttg gct ttg ttg agc atc ttt cag gag aca cca gcc 48  
Met Trp Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ile Phe Gln Glu Thr Pro Ala  
1 5 10 15  
ttc tcc ctt gag gcc tct gag gaa atg gaa cag gag ccc tgc cca gcc 96  
Phe Ser Leu Glu Ala Ser Glu Glu Met Glu Gln Glu Pro Cys Pro Ala  
20 25 30  
cca atc tcg gag cag caa gag cag gtg ttg act gtg gcc ctt ggg cag 144  
Pro Ile Ser Glu Gln Gln Glu Gln Val Leu Thr Val Ala Leu Gly Gln  
35 40 45  
cct gtg cgg cta tgc tgt ggc cgc act gag cgt ggt cgt cat tgg tac 192  
Pro Val Arg Leu Cys Cys Gly Arg Thr Glu Arg Gly Arg His Trp Tyr  
50 55 60  
aag gag ggc agc cgt tta gca tct gct ggg aga gta cgg ggc tgg aga 240  
Lys Glu Gly Ser Arg Leu Ala Ser Ala Gly Arg Val Arg Gly Trp Arg  
65 70 75 80  
ggc cgc ctg gag atc gcc agc ttc ctt cct gag gat gct ggc cgg tac 288  
Gly Arg Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala Gly Arg Tyr  
85 90 95

218

|                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| pctfr2009051343-seq1 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| ctc                  | tgc | ctg | gcc | cgt | ggc | tcc | atg | act | gtc | gta | cac | aat | ctt | act | ttg | 336  |
| Leu                  | Cys | Leu | Ala | Arg | Gly | Ser | Met | Thr | Val | Val | His | Asn | Leu | Thr | Leu |      |
|                      |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |      |
| att                  | atg | gat | gac | tcc | tta | ccc | tcc | atc | aat | aac | gag | gac | ccc | aag | acc | 384  |
| Ile                  | Met | Asp | Asp | Ser | Leu | Pro | Ser | Ile | Asn | Asn | Glu | Asp | Pro | Lys | Thr |      |
|                      |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |      |
| ctc                  | agc | agc | tcc | tcg | agt | ggg | cac | tcc | tac | ctg | cag | caa | gca | cct | tac | 432  |
| Leu                  | Ser | Ser | Ser | Ser | Ser | Gly | His | Ser | Tyr | Leu | Gln | Gln | Ala | Pro | Tyr |      |
|                      | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |      |
| tgg                  | aca | cac | ccc | caa | cgc | atg | gag | aag | aaa | ctg | cac | gcg | gta | cct | gcc | 480  |
| Trp                  | Thr | His | Pro | Gln | Arg | Met | Glu | Lys | Lys | Leu | His | Ala | Val | Pro | Ala |      |
| 145                  |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |      |
| ggg                  | aac | act | gtc | aaa | ttc | cgc | tgt | cca | gct | gca | ggg | aac | ccc | atg | ccc | 528  |
| Gly                  | Asn | Thr | Val | Lys | Phe | Arg | Cys | Pro | Ala | Ala | Gly | Asn | Pro | Met | Pro |      |
|                      |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |      |
| acc                  | atc | cac | tgg | ctc | aag | aac | gga | cag | gcc | ttc | cac | gga | gag | aat | cgt | 576  |
| Thr                  | Ile | His | Trp | Leu | Lys | Asn | Gly | Gln | Ala | Phe | His | Gly | Glu | Asn | Arg |      |
|                      |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |      |
| atc                  | gga | ggc | att | cgg | ctg | cgt | cac | caa | cac | tgg | agc | ctc | gtg | atg | gag | 624  |
| Ile                  | Gly | Gly | Ile | Arg | Leu | Arg | His | Gln | His | Trp | Ser | Leu | Val | Met | Glu |      |
|                      |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |      |
| agc                  | gtg | gtg | ccc | tca | gac | cgt | ggc | acg | tac | acg | tgt | ctt | gtg | gag | aac | 672  |
| Ser                  | Val | Val | Pro | Ser | Asp | Arg | Gly | Thr | Tyr | Thr | Cys | Leu | Val | Glu | Asn |      |
|                      | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |      |
| tct                  | ctg | ggt | agc | att | cgc | tac | agc | tat | ctg | ctg | gat | gtg | ctg | gag | cgg | 720  |
| Ser                  | Leu | Gly | Ser | Ile | Arg | Tyr | Ser | Tyr | Leu | Leu | Asp | Val | Leu | Glu | Arg |      |
| 225                  |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     | 240 |      |
| tcc                  | ccg | cac | cgg | ccc | atc | ctg | cag | gcg | gga | ctc | cca | gcc | aac | acc | acg | 768  |
| Ser                  | Pro | His | Arg | Pro | Ile | Leu | Gln | Ala | Gly | Leu | Pro | Ala | Asn | Thr | Thr |      |
|                      |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |
| gct                  | gtg | gtt | ggc | agc | aac | gtg | gag | ctg | ctg | tgc | aag | gtg | tac | agt | gac | 816  |
| Ala                  | Val | Val | Gly | Ser | Asn | Val | Glu | Leu | Leu | Cys | Lys | Val | Tyr | Ser | Asp |      |
|                      |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |      |
| gcc                  | cag | ccg | cac | atc | cag | tgg | ctg | aag | cac | atc | gtt | atc | aac | ggc | agc | 864  |
| Ala                  | Gln | Pro | His | Ile | Gln | Trp | Leu | Lys | His | Ile | Val | Ile | Asn | Gly | Ser |      |
|                      |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |
| agt                  | ttc | ggc | gct | gat | ggt | ttc | ccc | tac | gta | caa | gtc | ctg | aag | aca | aca | 912  |
| Ser                  | Phe | Gly | Ala | Asp | Gly | Phe | Pro | Tyr | Val | Gln | Val | Leu | Lys | Thr | Thr |      |
|                      | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |
| gac                  | atc | aat | agc | tca | gag | gtg | gag | gtg | ctg | tat | ctg | agg | aac | gtg | tcg | 960  |
| Asp                  | Ile | Asn | Ser | Ser | Glu | Val | Glu | Val | Leu | Tyr | Leu | Arg | Asn | Val | Ser |      |
| 305                  |     |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     |     |     | 320 |      |
| gct                  | gag | gat | gca | ggg | gag | tac | acc | tgc | ctg | gcg | ggc | aac | tcc | atc | ggc | 1008 |
| Ala                  | Glu | Asp | Ala | Gly | Glu | Tyr | Thr | Cys | Leu | Ala | Gly | Asn | Ser | Ile | Gly |      |
|                      |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| ctc                  | tcc | tac | cag | tca | gcg | tgg | ctc | aca | gtg | cta | ccc | gca | gag | gaa | gaa | 1056 |
| Leu                  | Ser | Tyr | Gln | Ser | Ala | Trp | Leu | Thr | Val | Leu | Pro | Ala | Glu | Glu | Glu |      |
|                      |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| gac                  | ctc | gcg | tgg | aca | aca | gca | aca | tcg | gag | gcc | aga | tat | aca | gat | att | 1104 |
| Asp                  | Leu | Ala | Trp | Thr | Thr | Ala | Thr | Ser | Glu | Ala | Arg | Tyr | Thr | Asp | Ile |      |
|                      |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| atc                  | cta | tat | gta | tct | ggc | tca | ctg | gct | ttg | gtt | ttg | ctc | ctg | ctg | ctg | 1152 |
| Ile                  | Leu | Tyr | Val | Ser | Gly | Ser | Leu | Ala | Leu | Val | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu |      |
|                      |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |
| gcc                  | ggg | gtg | tat | cac | cga | caa | gca | atc | cac | ggc | cac | cac | tct | cga | cag | 1200 |
| Ala                  | Gly | Val | Tyr | His | Arg | Gln | Ala | Ile | His | Gly | His | His | Ser | Arg | Gln |      |
| 385                  |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |      |

## pctfr2009051343-seq1

|                                                                                 |      |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| cct gtc act gta cag aag ctg tcc cgg ttc cct ttg gcc cgg cag ttc                 | 1248 |
| Pro Val Thr Val Gln Lys Leu Ser Arg Phe 410 Pro Leu Ala Arg Gln Phe 415         |      |
| tcc ttg gag tcg agg tcc tct ggc aag tca agt ttg tcc ctg gtg cga                 | 1296 |
| Ser Leu Glu Ser Arg Ser Ser Gly Lys Ser Ser Leu Ser Leu Val Arg 420 425 430     |      |
| ggg gtc cgg ctc tcc tcc agt ggc ccg ccc ttg ctc acg ggc ctt gtg                 | 1344 |
| Gly Val Arg Leu Ser Ser Ser Gly Pro Pro Leu Leu Thr Gly Leu Val 435 440 445     |      |
| agt cta gac cta cct ctc gat cca ctt tgg gag ttc ccc cgg gac agg                 | 1392 |
| Ser Leu Asp Leu Pro Leu Asp Pro Leu Trp Glu Phe 450 455 460                     |      |
| ctg gtg ctc gga aag ccc ctg ggt gag ggc tgc ttt ggg caa gtg gtt                 | 1440 |
| Leu Val Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val 465 470 475 480 |      |
| cgt gca gaa gcc ctt ggc atg gat tcc tcc cgg cca gac caa acc agc                 | 1488 |
| Arg Ala Glu Ala Leu Gly Met Asp Ser Ser Arg Pro Asp Gln Thr Ser 485 490 495     |      |
| acc gtg gct gtg aag atg ctg aaa gac aat gcc tcc gac aag gat ttg                 | 1536 |
| Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asn Ala Ser Asp Lys Asp Leu 500 505 510     |      |
| gca gac ctg atc tct gag atg gag atg atg aag cta atc gga aga cac                 | 1584 |
| Ala Asp Leu Ile Ser Glu Met Glu Met Met Lys Leu Ile Gly Arg His 515 520 525     |      |
| aag aac atc att aac ctg ctg ggt gtc tgc act cag gaa ggg ccc ctg                 | 1632 |
| Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Val Cys Thr Gln Glu Gly Pro Leu 530 535 540     |      |
| tat gtg att gtg gaa tat gcg gcc aag gga aac ctt cgg gaa ttc ctc                 | 1680 |
| Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu 545 550 555 560 |      |
| cgt gcc cgg cgt ccc cca ggc cct gat ctc agc cct gat ggg cct cgg                 | 1728 |
| Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Pro Asp Leu Ser Pro Asp Gly Pro Arg 565 570 575     |      |
| agc agc gaa gga ccg ctc tcc ttc ccg gcc ctg gtc tcc tgt gcc tac                 | 1776 |
| Ser Ser Glu Gly Pro Leu Ser Phe Pro Ala Leu Val Ser Cys Ala Tyr 580 585 590     |      |
| cag gtg gcc cga ggc atg cag tat ctg gag tct cgg aag tgc atc cac                 | 1824 |
| Gln Val Ala Arg Gly Met Gln Tyr Leu Glu Ser Arg Lys Cys Ile His 595 600 605     |      |
| cgg gac ctg gct gcc cga aac gtg ctg gtg acc gag gat gac gtg atg                 | 1872 |
| Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asp Val Met 610 615 620     |      |
| aag atc gct gac ttt ggt ctg gcc cgt ggt gtc cac cac atc gac tac                 | 1920 |
| Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Gly Val His His Ile Asp Tyr 625 630 635 640 |      |
| tat aag aaa acc agc aat ggc cgc ctg cca gtc aag tgg atg gct cct                 | 1968 |
| Tyr Lys Lys Thr Ser Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro 645 650 655     |      |
| gag gcg ttg ttt gac cgt gta tac aca cac cag agt gac gtg tgg tcc                 | 2016 |
| Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser 660 665 670     |      |
| ttc ggg atc ctg ctg tgg gaa atc ttc acc ctc ggg ggc tcc cca tac                 | 2064 |
| Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr 675 680 685     |      |
| ccc ggc atc cca gtg gag gag ctg ttc tca ctg ctg cga gag ggg cac                 | 2112 |
| Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Ser Leu Leu Arg Glu Gly His                 |      |

220

pctfr2009051343-seq1

|                                                                 |      |     |     |  |
|-----------------------------------------------------------------|------|-----|-----|--|
| 690                                                             |      | 695 | 700 |  |
| agg atg gag cgg ccc cca aac tgc ccc tca gag ctg tat ggg cta atg | 2160 |     |     |  |
| Arg Met Glu Arg Pro Pro Asn Cys Pro Ser Glu Leu Tyr Gly Leu Met |      |     |     |  |
| 705 710 715 720                                                 |      |     |     |  |
| agg gag tgt tgg cac gca gct cct tct cag agg ccg act ttt aag cag | 2208 |     |     |  |
| Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln |      |     |     |  |
| 725 730 735                                                     |      |     |     |  |
| ctg gtg gaa gct ctg gac aag gtc ctg ctg gct gtc tct gaa gag tac | 2256 |     |     |  |
| Leu Val Glu Ala Leu Asp Lys Val Leu Leu Ala Val Ser Glu Glu Tyr |      |     |     |  |
| 740 745 750                                                     |      |     |     |  |
| ctt gac ctc cgc ctg acc ttt gga ccc tat tcc ccc aac aat ggg gat | 2304 |     |     |  |
| Leu Asp Leu Arg Leu Thr Phe Gly Pro Tyr Ser Pro Asn Asn Gly Asp |      |     |     |  |
| 755 760 765                                                     |      |     |     |  |
| gcc agc agc acg tgc tcc tcc agc gac tcg gtt ttc agc cac gac cct | 2352 |     |     |  |
| Ala Ser Ser Thr Cys Ser Ser Ser Asp Ser Val Phe Ser His Asp Pro |      |     |     |  |
| 770 775 780                                                     |      |     |     |  |
| ttg ccc ctc gag cca agc ccc ttc cca ttt cct gag gcg cag acc aca | 2400 |     |     |  |
| Leu Pro Leu Glu Pro Ser Pro Phe Pro Phe Pro Glu Ala Gln Thr Thr |      |     |     |  |
| 785 790 795 800                                                 |      |     |     |  |
| tga                                                             | 2403 |     |     |  |

<210> 50  
 <211> 800  
 <212> PRT  
 <213> Rattus sp.  
 <400> 50

Met Trp Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ile Phe Gln Glu Thr Pro Ala  
 1 5 10 15

Phe Ser Leu Glu Ala Ser Glu Glu Met Glu Gln Glu Pro Cys Pro Ala  
 20 25 30

Pro Ile Ser Glu Gln Gln Glu Gln Val Leu Thr Val Ala Leu Gly Gln  
 35 40 45

Pro Val Arg Leu Cys Cys Gly Arg Thr Glu Arg Gly Arg His Trp Tyr  
 50 55 60

Lys Glu Gly Ser Arg Leu Ala Ser Ala Gly Arg Val Arg Gly Trp Arg  
 65 70 75 80

Gly Arg Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala Gly Arg Tyr  
 85 90 95

Leu Cys Leu Ala Arg Gly Ser Met Thr Val Val His Asn Leu Thr Leu  
 100 105 110

Ile Met Asp Asp Ser Leu Pro Ser Ile Asn Asn Glu Asp Pro Lys Thr  
 115 120 125

Leu Ser Ser Ser Ser Ser Gly His Ser Tyr Leu Gln Gln Ala Pro Tyr  
 130 135 140

Trp Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala  
 145 150 155 160

221

pctfr2009051343-seq1

Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Met Pro  
165 170 175

Thr Ile His Trp Leu Lys Asn Gly Gln Ala Phe His Gly Glu Asn Arg  
180 185 190

Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser Leu Val Met Glu  
195 200 205

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

Ser Leu Gly Ser Ile Arg Tyr Ser Tyr Leu Leu Asp Val Leu Glu Arg  
225 230 235 240

Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Thr Thr  
245 250 255

Ala Val Val Gly Ser Asn Val Glu Leu Leu Cys Lys Val Tyr Ser Asp  
260 265 270

Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val Ile Asn Gly Ser  
275 280 285

Ser Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val Leu Lys Thr Thr  
290 295 300

Asp Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu Arg Asn Val Ser  
305 310 315 320

Ala Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly  
325 330 335

Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu  
340 345 350

Asp Leu Ala Trp Thr Thr Ala Thr Ser Glu Ala Arg Tyr Thr Asp Ile  
355 360 365

Ile Leu Tyr Val Ser Gly Ser Leu Ala Leu Val Leu Leu Leu Leu  
370 375 380

Ala Gly Val Tyr His Arg Gln Ala Ile His Gly His His Ser Arg Gln  
385 390 395 400

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

Ser Leu Glu Ser Arg Ser Ser Gly Lys Ser Ser Leu Ser Leu Val Arg  
420 425 430

Gly Val Arg Leu Ser Ser Ser Gly Pro Pro Leu Leu Thr Gly Leu Val  
435 440 445

Ser Leu Asp Leu Pro Leu Asp Pro Leu Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg  
450 455 460

222

pctfr2009051343-seq1

Leu Val Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val  
465 470 475 480

Arg Ala Glu Ala Leu Gly Met Asp Ser Ser Arg Pro Asp Gln Thr Ser  
485 490 495

Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asn Ala Ser Asp Lys Asp Leu  
500 505 510

Ala Asp Leu Ile Ser Glu Met Glu Met Met Lys Leu Ile Gly Arg His  
515 520 525

Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Val Cys Thr Gln Glu Gly Pro Leu  
530 535 540

Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu  
545 550 555 560

Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Pro Asp Leu Ser Pro Asp Gly Pro Arg  
565 570 575

Ser Ser Glu Gly Pro Leu Ser Phe Pro Ala Leu Val Ser Cys Ala Tyr  
580 585 590

Gln Val Ala Arg Gly Met Gln Tyr Leu Glu Ser Arg Lys Cys Ile His  
595 600 605

Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asp Val Met  
610 615 620

Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Gly Val His His Ile Asp Tyr  
625 630 635 640

Tyr Lys Lys Thr Ser Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro  
645 650 655

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

Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr  
675 680 685

Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Ser Leu Leu Arg Glu Gly His  
690 695 700

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

Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln  
725 730 735

Leu Val Glu Ala Leu Asp Lys Val Leu Leu Ala Val Ser Glu Glu Tyr  
740 745 750

Leu Asp Leu Arg Leu Thr Phe Gly Pro Tyr Ser Pro Asn Asn Gly Asp

223

pctfr2009051343-seq1  
760 765

755

Ala Ser Ser Thr Cys Ser Ser Ser Asp Ser Val Phe Ser His Asp Pro  
770 775 780

Leu Pro Leu Glu Pro Ser Pro Phe Pro Phe Pro Glu Ala Gln Thr Thr  
785 790 795 800

<210> 51  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 51  
cggccgccag gtacctggaa ttcggcttgg g 31

<210> 52  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 52  
ctagaaggca ctctagaggc tgatctcgag c 31

<210> 53  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 53  
cgagctctgt acaa 14

<210> 54  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 54  
ctagttgtac agagctcggg ac 22

<210> 55  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 55  
gcgccgtcct ggagctcctg ctgctgaggt gg 32

<210> 56  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 56  
ggcaactaga aggcacagtc gagg 24

<210> 57  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 57  
gtccctggga tcctcgagga agtggag 27

<210> 58

227

pctfr2009051343-seq1

<211> 31  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 58  
gcgcctgccc gagctccagc ccggccagca g

31

<210> 59  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 59

Leu Ala Leu Ala Val Leu Leu Leu Ala Gly Leu Glu Leu Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Arg Trp Gln

<210> 60  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 60

Leu Ala Leu Ala Val Leu Leu Leu Leu Arg Trp Gln  
1 5 10

<210> 61  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 61  
ggccttggt gtgtcctgc tgctgaggtg gcagtttcct gcacactaca gg

52

<210> 62  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 62  
cctgtagtgt gcaggaaact gccacctcag cagcaggagc acagccaagg cc

52

<210> 63  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 63  
cgactggagc acgaggacac tga

23

<210> 64  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 64  
tatgcaaggc ttacaaccac a

21

<210> 65  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

225

pctfr2009051343-seq1

<400> 65  
ctcattcctg ttgaagctct tgac 24

<210> 66  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 66  
acactcagca cgggacaaac tcttctc 27

<210> 67  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Mus sp.

<400> 67  
acactctgca ggagacagac tcttttc 27

<210> 68  
<211> 1062  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1062)

<400> 68  
ctg gag gcc tct gag gaa gtg gag ctt gag ccc tgc ctg gct ccc agc 48  
Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro Cys Leu Ala Pro Ser  
1 5 10 15

ctg gag cag caa gag cag gag ctg aca gta gcc ctt ggg cag cct gtg 96  
Leu Glu Gln Gln Glu Gln Glu Leu Thr Val Ala Leu Gly Gln Pro Val  
20 25 30

cgg ctg tgc tgt ggg cgg gct gag cgt ggt ggc cac tgg tac aag gag 144  
Arg Leu Cys Cys Gly Arg Ala Glu Arg Gly Gly His Trp Tyr Lys Glu  
35 40 45

ggc agt cgc ctg gca cct gct ggc cgt gta cgg ggc tgg agg ggc cgc 192  
Gly Ser Arg Leu Ala Pro Ala Gly Arg Val Arg Gly Trp Arg Gly Arg  
50 55 60

cta gag att gcc agc ttc cta cct gag gat gct ggc cgc tac ctc tgc 240  
Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys  
65 70 75 80

ctg gca cga ggc tcc atg atc gtc ctg cag aat ctc acc ttg att aca 288  
Leu Ala Arg Gly Ser Met Ile Val Leu Gln Asn Leu Thr Leu Ile Thr  
85 90 95

ggt gac tcc ttg acc tcc agc aac gat gat gag gac ccc aag tcc cat 336  
Gly Asp Ser Leu Thr Ser Ser Asn Asp Asp Glu Asp Pro Lys Ser His  
100 105 110

agg gac ctc tcg aat agg cac agt tac ccc cag caa gca ccc tac tgg 384  
Arg Asp Leu Ser Asn Arg His Ser Tyr Pro Gln Gln Ala Pro Tyr Trp  
115 120 125

aca cac ccc cag cgc atg gag aag aaa ctg cat gca gta cct gcg ggg 432  
Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Gly  
130 135 140

aac acc gtc aag ttc cgc tgt cca gct gca ggc aac ccc acg ccc acc 480  
Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Thr  
145 150 155 160

atc cgc tgg ctt aag gat gga cag gcc ttt cat ggg gag aac cgc att 528  
Ile Arg Trp Leu Lys Asp Gly Gln Ala Phe His Gly Glu Asn Arg Ile

pctfr2009051343-seq1  
170

[illegible]

|       |              |
|-------|--------------|
| <210> | 69           |
| <211> | 353          |
| <212> | PRT          |
| <213> | Homo sapiens |

**<400> 69**

Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro Cys Leu Ala Pro Ser  
1 5 10 15

Leu Glu Gln Gln Glu Gln Glu Leu Thr Val Ala Leu Gly Gln Pro Val  
20 25 30

Arg Leu Cys Cys Gly Arg Ala Glu Arg Gly Gly His Trp Tyr Lys Glu  
35 40 45

Gly Ser Arg Leu Ala Pro Ala Gly Arg Val Arg Gly Trp Arg Gly Arg  
50 55 60

Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys

227

pctfr2009051343-seq1  
75

65 70 75 80

Leu Ala Arg Gly Ser Met Ile Val Leu Gln Asn Leu Thr Leu Ile Thr  
85

Gly Asp Ser Leu Thr Ser Ser Asn Asp Asp Glu Asp Pro Lys Ser His  
100

Arg Asp Leu Ser Asn Arg His Ser Tyr Pro Gln Gln Ala Pro Tyr Trp  
115

Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Gly  
130

Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Thr  
145

Ile Arg Trp Leu Lys Asp Gly Gln Ala Phe His Gly Glu Asn Arg Ile  
165

Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser Leu Val Met Glu Ser  
180

Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys Leu Val Glu Asn Ala  
195

Val Gly Ser Ile Arg Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser  
210

Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Thr Thr Ala  
225

Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu Leu Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala  
245

Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val Ile Asn Gly Ser Ser  
260

Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val Leu Lys Thr Ala Asp  
275

Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu Arg Asn Val Ser Ala  
290

Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu  
305

Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Pro Glu Glu Asp Pro Thr Trp  
325

Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu  
340

Lys

228

pctfr2009051343-seq1

<210> 70  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 70

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

<210> 71  
<211> 648  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(648)

<400> 71  
cag agc gaa ttg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag 48  
Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
agg gtc acc atc tct tgt tct gga ggc tac tcc aac atg gga agc aat 96  
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Asn Met Gly Ser Asn  
20 25 30  
tat gca cac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc 144  
Tyr Ala His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
atc tat aac aat aat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct 192  
Ile Tyr Asn Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cgg 240  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg  
65 70 75 80  
tcc gag gat gag gct gat tat tac tgt gca gca tgg gat gac agc ctg 288  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95  
agt ggt ccg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt cag 336  
Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
100 105 110  
ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct gag gag 384  
Página 50

229

pctfr2009051343-seq1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Pro | Lys | Ala | Ala | Pro | Ser | Val | Thr | Leu | Phe | Pro | Pro | Ser | Ser | Glu | Glu |     |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |  |
| ctt | caa | gcc | aac | aag | gcc | aca | ctg | gtg | tgt | ctg | atc | agt | gac | ttc | tac | 432 |  |
| Leu | Gln | Ala | Asn | Lys | Ala | Thr | Leu | Val | Cys | Leu | Ile | Ser | Asp | Phe | Tyr |     |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |  |
| ccg | gga | gct | gtg | aca | gtg | gcc | tgg | aag | gca | gat | ggc | agc | ccc | gtc | aag | 480 |  |
| Pro | Gly | Ala | Val | Thr | Val | Ala | Trp | Lys | Ala | Asp | Gly | Ser | Pro | Val | Lys |     |  |
|     | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |     |  |
| gcg | gga | gtg | gag | acc | acc | aca | ccc | tcc | aaa | caa | agc | aac | aac | aag | tac | 528 |  |
| Ala | Gly | Val | Glu | Thr | Thr | Thr | Pro | Ser | Lys | Gln | Ser | Asn | Asn | Lys | Tyr |     |  |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |  |
| gcg | gcc | agc | agc | tat | ctg | agc | ctg | acg | cct | gag | cag | tgg | aag | tcc | cac | 576 |  |
| Ala | Ala | Ser | Ser | Tyr | Leu | Ser | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Trp | Lys | Ser | His |     |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |  |
| aga | agc | tac | agc | tgc | cag | gtc | acg | cat | gaa | ggg | agc | acc | gtg | gag | aag | 624 |  |
| Arg | Ser | Tyr | Ser | Cys | Gln | Val | Thr | His | Glu | Gly | Ser | Thr | Val | Glu | Lys |     |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |  |
| aca | gtg | gcc | cct | aca | gaa | tgt | tca |     |     |     |     |     |     |     |     | 648 |  |
| Thr | Val | Ala | Pro | Thr | Glu | Cys | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

<210> 72  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 72

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

230

pctfr2009051343-seq1  
Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
210 215

<210> 73  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 73

Ser Asn Met Gly Ser Asn Tyr Ala His  
1 5

<210> 74  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 74

Tyr Asn Asn Asn Gln  
1 5

<210> 75  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly  
1 5

<210> 76  
<211> 411  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(411)

<400> 76  
gaa gtt caa ttg tta gag tct ggt ggc ggt ctt gtt cag cct ggt ggt 48  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

tct tta cgt ctt tct tgc gct gct tcc gga ttc act ttc tct cct tac 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Tyr  
20 25 30

tgg atg ggt tgg gtt cgc caa gct cct ggt aaa ggt ttg gag tgg gtt 144  
Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

tct gtt atc tgg cct tct ggt ggc act act gat tat gct gac tcc gtt 192  
Ser Val Ile Trp Pro Ser Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

231

pctfr2009051343-seq1

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| aaa ggt cgc ttc act atc tct aga gac aac tct aag aat act ctc tac | 240 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| ttg cag atg aac agc tta agg gct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt | 288 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| gcg aga gtc cat cca gct ggc cac aac gac cac tgg ggc cag gga acc | 336 |
| Ala Arg Val His Pro Ala Gly His Asn Asp His Trp Gly Gln Gly Thr |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| ctg gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccg | 384 |
| Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| cta gca ccc tcc tcc aag agc acc tct                             | 411 |
| Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser                             |     |
| 130 135                                                         |     |

<210> 77  
<211> 137  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 77

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

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 78

|                                     |
|-------------------------------------|
| Phe Thr Phe Ser Pro Tyr Trp Met Gly |
| 1 5                                 |

232

pctfr2009051343-seq1

<210> 79  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 79

Val Ile Trp Pro Ser Gly Gly Thr Thr Asp  
1 5 10

<210> 80  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 80

Arg Val His Pro Ala Gly His Asn Asp His  
1 5 10

<210> 81  
<211> 645  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(645)

<400> 81  
caa gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct ttg tct cca 48  
Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
1 5 10 15  
ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt att aac aga 96  
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Arg  
20 25 30  
aac tta ggc tgg tac cag cag aag cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144  
Asn Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45  
atc tat ggt gcg tcc acc agg gcc act ggt atc cca gcc agg ttc act 192  
Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Thr  
50 55 60  
ggc agt ggg tct ggg aca gag ttc tct ctc acc atc agc agc ctg cag 240  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
65 70 75 80  
tct gaa gat tat gca att tat tat tgt cag cag tat gat aac tgg ccg 288  
Ser Glu Asp Tyr Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Trp Pro  
85 90 95  
atc atc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa gga act gtg gct 336  
Ile Ile Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Thr Val Ala  
100 105 110  
gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct 384  
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
115 120 125  
gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag 432  
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
130 135 140  
gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc 480  
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
145 150 155 160  
cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc 528

233

pctfr2009051343-seq1  
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 165 170 175  
 agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc 576  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
 180 185 190  
 tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag 624  
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
 195 200 205  
 agc ttc aac agg gga gag tgt 645  
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 82  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 82

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

234

pctfr2009051343-seq1

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 83  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 83

Ser Ile Asn Arg Asn Leu Gly  
1 5

<210> 84  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 84

Tyr Gly Ala Ser Thr  
1 5

<210> 85  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 85

Gln Tyr Asp Asn Trp Pro  
1 5

<210> 86  
<211> 411  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(411)

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 86                                                        |     |
| gaa gtt caa ttg tta gag tct ggt ggc ggt ctt gtt cag cct ggt ggt | 48  |
| Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| tct tta cgt ctt tct tgc gct gct tcc gga ttc act ttc tct cgt tac | 96  |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| ttt atg aag tgg gtt cgc caa gct cct ggt aaa ggt ttg gag tgg gtt | 144 |
| Phe Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| tct tgg atc tct cct tct ggt ggc ctt act gag tat gct gac tcc gtt | 192 |
| Ser Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| aaa ggt cgc ttc act atc tct aga gac aac tct aag aat act ctc tac | 240 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| ttg cag atg aac agc tta agg gct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt | 288 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| gcc aga gcc tca tac ggt gcc tgg ctg gac tac tgg ggc cag ggc acc | 336 |
| Ala Arg Ala Ser Tyr Gly Ala Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr |     |
| 100 105 110                                                     |     |

235

pctfr2009051343-seq1

ctg gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccg 384  
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
115 120 125

cta gca ccc tcc tcc aag agc acc tct 411  
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
130 135

<210> 87  
<211> 137  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 87

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

Phe Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ala Ser Tyr Gly Ala Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
130 135

<210> 88  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 88

Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Phe Met Lys  
1 5

<210> 89  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 89

Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Glu  
1 5 10

236

pctfr2009051343-seq1

<210> 90  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 90

Arg Ala Ser Tyr Gly Ala Trp Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 91  
<211> 651  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(651)

<400> 91  
cag agc gtc ttg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggc cag 48  
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15

ggg gtc acc atc tct tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga agt aat 96  
Gly Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
20 25 30

agt gtt aac tgg tac cag cag ctc cca gga gcg gcc ccc aaa ctc ctc 144  
Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

atc tat agt aac aat ctg cgg ccc tca ggg gtc cct gcc cga ttc tct 192  
Ile Tyr Ser Asn Asn Leu Arg Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
50 55 60

ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggc ctc cgg 240  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg  
65 70 75 80

tct gag gat gag gct gat tat tac tgt gca gcc tgg gat gac ggc ctg 288  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Gly Leu  
85 90 95

gat gcc tat gtg gtg ttc ggc gga ggg acc aaa ctg acc gtc ctg ggt 336  
Asp Ala Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

cag ccc aag gcc aac ccc act gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct gag 384  
Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

gag ctc caa gcc aac aag gcc aca cta gtg tgt ctg atc agt gac ttc 432  
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
130 135 140

tac ccg gga gct gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat ggc agc ccc gtc 480  
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val  
145 150 155 160

aag gcg gga gtg gag acc acc aaa ccc tcc aaa cag agc aac aac aag 528  
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
165 170 175

tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg ccc gag cag tgg aag tcc 576  
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
180 185 190

cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag 624  
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
195 200 205

aag aca gtg gcc cct gca gaa tgc tct 651

2267

pctfr2009051343-seq1  
Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser  
210 215

<210> 92  
<211> 217  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 92

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Gly Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
20 25 30

Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Leu Arg Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Gly Leu  
85 90 95

Asp Ala Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val  
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser  
210 215

<210> 93  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 93

Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn

## pctfr2009051343-seq1

1

5

<210> 94  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 94

Tyr Ser Asn Asn Leu  
 1 5

<210> 95  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 95

Ala Trp Asp Asp Gly Leu Asp Ala Tyr  
 1 5

<210> 96  
 <211> 414  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(414)

<400> 96  
 gaa gtt caa ttg tta gag tct ggt ggc ggt ctt gtt cag cct ggt ggt 48  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tct tta cgt ctt tct tgc gct gct tcc gga ttc act ttc tct act tac 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 tgg atg gct tgg gtt cgc caa gct cct ggt aaa ggt ttg gag tgg gtt 144  
 Trp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 tct gtt atc ggt cct tct ggt ggc atg act gtt tat gct gac tcc gtt 192  
 Ser Val Ile Gly Pro Ser Gly Gly Met Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 aaa ggt cgc ttc act atc tct aga gac aac tct aag aat act ctc tac 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 ttg cag atg aac agc tta agg gct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 gca cgg att aat agt ggg agc tcc cac ttt gac tac tgg ggc cag gga 336  
 Ala Arg Ile Asn Ser Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 acc ctg gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc 384  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125  
 ccg cta gca ccc tcc tcc aag agc acc tct 414  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 130 135

<210> 97  
 <211> 138

239

pctfr2009051343-seq1

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 97

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
20 25 30

Trp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Val Ile Gly Pro Ser Gly Gly Met Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ile Asn Ser Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
130 135

<210> 98  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 98

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp Met Ala  
1 5

<210> 99  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 99

Val Ile Gly Pro Ser Gly Gly Met Thr Val  
1 5 10

<210> 100  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 100

Arg Ile Asn Ser Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 101

240

pctfr2009051343-seq1

<211> 651  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(651)

<400> 101  
 cag tac gaa ttg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag 48  
 Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga agc aat 96  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
 20 25 30  
 att gta cac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc 144  
 Ile Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45  
 ata tat ggt aat aat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct 192  
 Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 gtc tcc aag tct ggc tcc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cag 240  
 Val Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
 65 70 75 80  
 tct gag gat gag gct gat tat tac tgt gca tca tgg gat gac agc ctg 288  
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu  
 85 90 95  
 aaa gcc ttt tat gtc ttc gga act ggg acc aag gtc acc gtc cta ggt 336  
 Lys Ala Phe Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
 cag ccc aag gcc aac ccc act gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct gag 384  
 Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125  
 gag ctc caa gcc aac aag gcc aca cta gtg tgt ctg atc agt gac ttc 432  
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 130 135 140  
 tac ccg gga gct gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat ggc agc ccc gtc 480  
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val  
 145 150 155 160  
 aag gcg gga gtg gag acc acc aaa ccc tcc aaa cag agc aac aac aag 528  
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 165 170 175  
 tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg ccc gag cag tgg aag tcc 576  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 180 185 190  
 cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag 624  
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
 195 200 205  
 aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca 651  
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 210 215

<210> 102  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 102

Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
 Página 62

241

pctfr2009051343-seq1

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
20 25 30

Ile Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Val Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Lys Ala Phe Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
100 105 110

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val  
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
210 215

<210> 103  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 103

Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ile Val His  
1 5

<210> 104  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 104

Tyr Gly Asn Asn Gln  
1 5

242

pctfr2009051343-seq1

<210> 105  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 105

Ser Trp Asp Asp Ser Leu Lys Ala Phe  
1 5

<210> 106  
<211> 420  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(420)

<400> 106  
gaa gtt caa ttg tta gag tct ggt ggc ggt ctt gtt cag cct ggt ggt 48  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
tct tta cgt ctt tct tgc gct gct tcc gga ttc act ttc tct cat tac 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr  
20 25 30  
tgg atg ggt tgg gtt cgc caa gct cct ggt aaa ggt ttg gag tgg gtt 144  
Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
tct gtt atc tct cct tct ggt ggc ctt act att tat gct gac tcc gtt 192  
Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
aaa ggt cgc ttc act atc tct aga gac aac tct aag aat act ctc tac 240  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
ttg cag atg aac agc tta agg gct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
gca cgg agc agt ggc tgg gct ctg gat gct ttt gat atc tgg ggc caa 336  
Ala Arg Ser Ser Gly Trp Ala Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110  
ggg aca atg gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc 384  
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125  
ttc ccg cta gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg 420  
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
130 135 140

<210> 107  
<211> 140  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 107

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr  
20 25 30

243

pctfr2009051343-seq1

Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Ser Ser Gly Trp Ala Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125  
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
130 135 140

<210> 108  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 108

Phe Thr Phe Ser His Tyr Trp Met Gly  
1 5

<210> 109  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 109

Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Ile  
1 5 10

<210> 110  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 110

Arg Ser Ser Gly Trp Ala Leu Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 111  
<211> 1215  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1215)

<400> 111  
atg cgg ctg ctg ctg gcc ctg ttg ggg gtc ctg ctg agt gtg cct ggg  
Met Arg Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Ser Val Pro Gly  
Página 65

294

pctfr2009051343-seq1

| 1                 |                   |                   |                   |                   | 5                 |                   |                   |                   |                   | 10                |                   |                   |                   |                   | 15                |     |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|
| cct<br>Pro        | cca<br>Pro        | gtc<br>Val        | ttg<br>Leu<br>20  | tcc<br>Ser        | ctg<br>Leu        | gag<br>Glu        | gcc<br>Ala        | tct<br>Ser<br>25  | gag<br>Glu        | gaa<br>Glu        | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | ctt<br>Leu<br>30  | gag<br>Glu        | ccc<br>Pro        | 96  |
| tgc<br>Cys        | ctg<br>Leu        | gct<br>Ala<br>35  | ccc<br>Pro        | agc<br>Ser        | ctg<br>Leu        | gag<br>Glu        | cag<br>Gln<br>40  | caa<br>Gln        | gag<br>Glu        | cag<br>Gln        | gag<br>Glu        | ctg<br>Leu<br>45  | aca<br>Thr        | gta<br>Val        | gcc<br>Ala        | 144 |
| ctt<br>Leu        | ggg<br>Gly<br>50  | cag<br>Gln        | cct<br>Pro        | gtg<br>Val        | cgg<br>Arg        | ctg<br>Leu<br>55  | tgc<br>Cys        | tgt<br>Cys        | ggg<br>Gly        | cgg<br>Arg        | gct<br>Ala<br>60  | gag<br>Glu        | cgt<br>Arg        | ggt<br>Gly        | ggc<br>Gly        | 192 |
| cac<br>His<br>65  | tgg<br>Trp        | tac<br>Tyr        | aag<br>Lys        | gag<br>Glu        | ggc<br>Gly<br>70  | agt<br>Ser        | cgc<br>Arg        | ctg<br>Leu        | gca<br>Ala        | cct<br>Pro<br>75  | gct<br>Ala        | ggc<br>Gly        | cgt<br>Arg        | gta<br>Val        | cgg<br>Arg<br>80  | 240 |
| ggc<br>Gly        | tgg<br>Trp        | agg<br>Arg        | ggc<br>Gly        | cgc<br>Arg<br>85  | cta<br>Leu        | gag<br>Glu        | att<br>Ile        | gcc<br>Ala        | agc<br>Ser<br>90  | ttc<br>Phe        | cta<br>Leu        | cct<br>Pro        | gag<br>Glu        | gat<br>Asp<br>95  | gct<br>Ala        | 288 |
| ggc<br>Gly        | cgc<br>Arg        | tac<br>Tyr        | ctc<br>Leu<br>100 | tgc<br>Cys        | ctg<br>Leu        | gca<br>Ala        | cga<br>Arg        | ggc<br>Gly<br>105 | tcc<br>Ser        | atg<br>Met        | atc<br>Ile        | gtc<br>Val        | ctg<br>Leu<br>110 | cag<br>Gln        | aat<br>Asn        | 336 |
| ctc<br>Leu        | acc<br>Thr        | ttg<br>Leu<br>115 | att<br>Ile        | aca<br>Thr        | ggt<br>Gly        | gac<br>Asp        | tcc<br>Ser<br>120 | ttg<br>Leu        | acc<br>Thr        | tcc<br>Ser        | agc<br>Ser        | aac<br>Asn<br>125 | gat<br>Asp        | gat<br>Asp        | gag<br>Glu        | 384 |
| gac<br>Asp        | ccc<br>Pro<br>130 | aag<br>Lys        | tcc<br>Ser        | cat<br>His        | agg<br>Arg        | gac<br>Asp<br>135 | ctc<br>Leu        | tcg<br>Ser        | aat<br>Asn        | agg<br>Arg        | cac<br>His<br>140 | agt<br>Ser        | tac<br>Tyr        | ccc<br>Pro        | cag<br>Gln        | 432 |
| caa<br>Gln<br>145 | gca<br>Ala        | ccc<br>Pro        | tac<br>Tyr        | tgg<br>Trp        | aca<br>Thr<br>150 | cac<br>His        | ccc<br>Pro        | cag<br>Gln        | cgc<br>Arg        | atg<br>Met<br>155 | gag<br>Glu        | aag<br>Lys        | aaa<br>Lys        | ctg<br>Leu        | cat<br>His<br>160 | 480 |
| gca<br>Ala        | gta<br>Val        | cct<br>Pro        | gcg<br>Ala        | ggg<br>Gly<br>165 | aac<br>Asn        | acc<br>Thr        | gtc<br>Val        | aag<br>Lys        | ttc<br>Phe<br>170 | cgc<br>Arg        | tgt<br>Cys        | cca<br>Pro        | gct<br>Ala        | gca<br>Ala<br>175 | ggc<br>Gly        | 528 |
| aac<br>Asn        | ccc<br>Pro        | acg<br>Thr        | aaa<br>Lys<br>180 | act<br>Thr        | cac<br>His        | aca<br>Thr        | tgc<br>Cys        | cca<br>Pro<br>185 | ccg<br>Pro        | tgc<br>Cys        | cca<br>Pro        | gca<br>Ala        | cct<br>Pro<br>190 | gaa<br>Glu        | ctc<br>Leu        | 576 |
| ctg<br>Leu        | ggg<br>Gly        | gga<br>Gly<br>195 | ccg<br>Pro        | tca<br>Ser        | gtc<br>Val        | ttc<br>Phe        | ctc<br>Leu<br>200 | ttc<br>Phe        | ccc<br>Pro        | cca<br>Pro        | aaa<br>Lys        | ccc<br>Pro<br>205 | aag<br>Lys        | gac<br>Asp        | acc<br>Thr        | 624 |
| ctc<br>Leu        | atg<br>Met<br>210 | atc<br>Ile        | tcc<br>Ser        | cgg<br>Arg        | acc<br>Thr        | cct<br>Pro<br>215 | gag<br>Glu        | gtc<br>Val        | aca<br>Thr        | tgc<br>Cys        | gtg<br>Val<br>220 | gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | gtg<br>Val        | 672 |
| agc<br>Ser<br>225 | cac<br>His        | gaa<br>Glu        | gac<br>Asp        | cct<br>Pro        | gag<br>Glu<br>230 | gtc<br>Val        | aag<br>Lys        | ttc<br>Phe        | aac<br>Asn        | tgg<br>Trp<br>235 | tac<br>Tyr        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | ggc<br>Gly        | gtg<br>Val<br>240 | 720 |
| gag<br>Glu        | gtg<br>Val        | cat<br>His        | aat<br>Asn        | gcc<br>Ala<br>245 | aag<br>Lys        | aca<br>Thr        | aag<br>Lys        | ccg<br>Pro        | cgg<br>Arg<br>250 | gag<br>Glu        | gag<br>Glu        | cag<br>Gln        | tac<br>Tyr        | aac<br>Asn<br>255 | agc<br>Ser        | 768 |
| acg<br>Thr        | tac<br>Tyr        | cgt<br>Arg        | gtg<br>Val<br>260 | gtc<br>Val        | agc<br>Ser        | gtc<br>Val        | ctc<br>Leu        | acc<br>Thr<br>265 | gtc<br>Val        | ctg<br>Leu        | cac<br>His        | cag<br>Gln        | gac<br>Asp<br>270 | tgg<br>Trp        | ctg<br>Leu        | 816 |
| aat<br>Asn        | ggc<br>Gly        | aag<br>Lys<br>275 | gag<br>Glu        | tac<br>Tyr        | aag<br>Lys        | tgc<br>Cys        | aag<br>Lys<br>280 | gtc<br>Val        | tcc<br>Ser        | aac<br>Asn        | aaa<br>Lys        | gcc<br>Ala<br>285 | ctc<br>Leu        | cca<br>Pro        | gcc<br>Ala        | 864 |
| ccc<br>Pro        | atc<br>Ile<br>290 | gag<br>Glu        | aaa<br>Lys        | acc<br>Thr        | atc<br>Ile        | tcc<br>Ser<br>295 | aaa<br>Lys        | gcc<br>Ala        | aaa<br>Lys        | ggg<br>Gly        | cag<br>Gln<br>300 | ccc<br>Pro        | cga<br>Arg        | gaa<br>Glu        | cca<br>Pro        | 912 |
| cag               | gtg               | tac               | acc               | ctg               | ccc               | cca               | tcc               | cgg               | gat               | gag               | ctg               | acc               | aag               | aac               | cag               | 960 |

245

pctfr2009051343-seq1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln |      |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| gtc | agc | ctg | acc | tgc | ctg | gtc | aaa | ggc | ttc | tat | ccc | agc | gac | atc | gcc | 1008 |
| Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     | 335 |     |      |
| gtg | gag | tgg | gag | agc | aat | ggg | cag | ccg | gag | aac | aac | tac | aag | acc | acg | 1056 |
| Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| cct | ccc | gtg | ctg | gac | tcc | gac | ggc | tcc | ttc | ttc | ctc | tac | agc | aag | ctc | 1104 |
| Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu |      |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| acc | gtg | gac | aag | agc | agg | tgg | cag | cag | ggg | aac | gtc | ttc | tca | tgc | tcc | 1152 |
| Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser |      |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |
| gtg | atg | cat | gag | gct | ctg | cac | aac | cac | tac | acg | cag | aag | agc | ctc | tcc | 1200 |
| Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser |      |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |     |      |
| ctg | tct | ccg | ggg | tga |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1215 |
| Leu | Ser | Pro | Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |

<210> 112  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 112

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

246

pctfr2009051343-seq1  
Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly  
165 170 175  
Asn Pro Thr Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
180 185 190  
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
195 200 205  
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
210 215 220  
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
225 230 235 240  
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
245 250 255  
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
260 265 270  
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
275 280 285  
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
290 295 300  
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
305 310 315 320  
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
325 330 335  
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
340 345 350  
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
355 360 365  
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
370 375 380  
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
385 390 395 400  
Leu Ser Pro Gly

<210> 113  
<211> 1068  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1068)

<400> 113

247

pctfr2009051343-seq1

|                   |                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |     |
|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|
| atg<br>Met<br>1   | cgg<br>Arg       | ctg<br>Leu        | ctg<br>Leu        | ctg<br>Leu<br>5   | gcc<br>Ala        | ctg<br>Leu        | ttg<br>Leu        | ggg<br>Gly<br>10  | gtc<br>Val<br>10  | ctg<br>Leu        | ctg<br>Leu        | agt<br>Ser        | gtg<br>Val<br>15  | cct<br>Pro<br>15  | ggg<br>Gly        | 48  |
| cct<br>Pro        | cca<br>Pro       | gtc<br>Val<br>20  | ttg<br>Leu<br>20  | tcc<br>Ser        | ctg<br>Leu        | gag<br>Glu        | gcc<br>Ala<br>25  | tct<br>Ser<br>25  | gag<br>Glu        | gaa<br>Glu        | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | ctt<br>Leu<br>30  | gag<br>Glu        | ccc<br>Pro        | 96  |
| caa<br>Gln        | gca<br>Ala<br>35 | ccc<br>Pro<br>35  | tac<br>Tyr        | tgg<br>Trp        | aca<br>Thr        | cac<br>His<br>40  | ccc<br>Pro<br>40  | cag<br>Gln        | cgc<br>Arg        | atg<br>Met        | gag<br>Glu        | aag<br>Lys<br>45  | aaa<br>Lys        | ctg<br>Leu        | cat<br>His        | 144 |
| gca<br>Ala<br>50  | gta<br>Val<br>50 | cct<br>Pro        | gcg<br>Ala        | ggg<br>Gly        | aac<br>Asn<br>55  | acc<br>Thr<br>55  | gtc<br>Val        | aag<br>Lys        | ttc<br>Phe        | cgc<br>Arg        | tgt<br>Cys<br>60  | cca<br>Pro        | gct<br>Ala        | gca<br>Ala        | ggc<br>Gly        | 192 |
| aac<br>Asn<br>65  | ccc<br>Pro       | acg<br>Thr        | ccc<br>Pro        | acc<br>Thr        | atc<br>Ile<br>70  | cgc<br>Arg        | tgg<br>Trp        | ctt<br>Leu        | aag<br>Lys        | gat<br>Asp<br>75  | gga<br>Gly        | cag<br>Gln        | gcc<br>Ala        | ttt<br>Phe        | cat<br>His<br>80  | 240 |
| ggg<br>Gly        | gag<br>Glu       | aac<br>Asn        | cgc<br>Arg        | att<br>Ile<br>85  | gga<br>Gly        | ggc<br>Gly        | att<br>Ile        | cgg<br>Arg        | ctg<br>Leu<br>90  | cgc<br>Arg        | cat<br>His        | cag<br>Gln        | cac<br>His        | tgg<br>Trp<br>95  | agt<br>Ser        | 288 |
| ctc<br>Leu        | gtg<br>Val       | atg<br>Met        | gag<br>Glu<br>100 | agc<br>Ser        | gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | ccc<br>Pro        | tcg<br>Ser<br>105 | gac<br>Asp        | cgc<br>Arg        | ggc<br>Gly        | aca<br>Thr        | tac<br>Tyr<br>110 | acc<br>Thr        | tgc<br>Cys        | 336 |
| ctg<br>Leu        | gta<br>Val       | gag<br>Glu<br>115 | aac<br>Asn        | gct<br>Ala        | gtg<br>Val        | ggc<br>Gly        | agc<br>Ser<br>120 | atc<br>Ile        | cgt<br>Arg        | tat<br>Tyr        | aac<br>Asn        | tac<br>Tyr<br>125 | ctg<br>Leu        | cta<br>Leu        | gat<br>Asp        | 384 |
| gtg<br>Val<br>130 | ctg<br>Leu       | aaa<br>Lys        | act<br>Thr        | cac<br>His        | aca<br>Thr        | tgc<br>Cys<br>135 | cca<br>Pro        | ccg<br>Pro        | tgc<br>Cys        | cca<br>Pro        | gca<br>Ala<br>140 | cct<br>Pro        | gaa<br>Glu        | ctc<br>Leu        | ctg<br>Leu        | 432 |
| ggg<br>Gly<br>145 | gga<br>Gly       | ccg<br>Pro        | tca<br>Ser        | gtc<br>Val        | ttc<br>Phe<br>150 | ctc<br>Leu        | ttc<br>Phe        | ccc<br>Pro        | cca<br>Pro        | aaa<br>Lys<br>155 | ccc<br>Pro        | aag<br>Lys        | gac<br>Asp        | acc<br>Thr        | ctc<br>Leu<br>160 | 480 |
| atg<br>Met        | atc<br>Ile       | tcc<br>Ser        | cgg<br>Arg        | acc<br>Thr<br>165 | cct<br>Pro        | gag<br>Glu        | gtc<br>Val        | aca<br>Thr        | tgc<br>Cys<br>170 | gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | gtg<br>Val<br>175 | agc<br>Ser        | 528 |
| cac<br>His        | gaa<br>Glu       | gac<br>Asp        | cct<br>Pro<br>180 | gag<br>Glu        | gtc<br>Val        | aag<br>Lys        | ttc<br>Phe<br>185 | aac<br>Asn        | tgg<br>Trp        | tac<br>Tyr        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | ggc<br>Gly<br>190 | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | 576 |
| gtg<br>Val        | cat<br>His       | aat<br>Asn<br>195 | gcc<br>Ala        | aag<br>Lys        | aca<br>Thr        | aag<br>Lys        | ccg<br>Pro<br>200 | cgg<br>Arg        | gag<br>Glu        | gag<br>Glu        | cag<br>Gln        | tac<br>Tyr<br>205 | aac<br>Asn        | agc<br>Ser        | acg<br>Thr        | 624 |
| tac<br>Tyr<br>210 | cgt<br>Arg       | gtg<br>Val        | gtc<br>Val        | agc<br>Ser        | gtc<br>Val        | ctc<br>Leu<br>215 | acc<br>Thr        | gtc<br>Val        | ctg<br>Leu        | cac<br>His        | cag<br>Gln<br>220 | gac<br>Asp        | tgg<br>Trp        | ctg<br>Leu        | aat<br>Asn        | 672 |
| ggc<br>Gly<br>225 | aag<br>Lys       | gag<br>Glu        | tac<br>Tyr        | aag<br>Lys        | tgc<br>Cys<br>230 | aag<br>Lys        | gtc<br>Val        | tcc<br>Ser        | aac<br>Asn        | aaa<br>Lys<br>235 | gcc<br>Ala        | ctc<br>Leu        | cca<br>Pro        | gcc<br>Ala        | ccc<br>Pro<br>240 | 720 |
| atc<br>Ile        | gag<br>Glu       | aaa<br>Lys        | acc<br>Thr<br>245 | atc<br>Ile        | tcc<br>Ser        | aaa<br>Lys        | gcc<br>Ala        | aaa<br>Lys        | ggg<br>Gly<br>250 | cag<br>Gln        | ccc<br>Pro        | cga<br>Arg        | gaa<br>Glu        | cca<br>Pro<br>255 | cag<br>Gln        | 768 |
| gtg<br>Val        | tac<br>Tyr       | acc<br>Thr        | ctg<br>Leu<br>260 | ccc<br>Pro        | cca<br>Pro        | tcc<br>Ser        | cgg<br>Arg        | gat<br>Asp<br>265 | gag<br>Glu        | ctg<br>Leu        | acc<br>Thr        | aag<br>Lys        | aac<br>Asn        | cag<br>Gln        | gtc<br>Val        | 816 |
| agc<br>Ser        | ctg<br>Leu       | acc<br>Thr<br>275 | tgc<br>Cys        | ctg<br>Leu        | gtc<br>Val        | aaa<br>Lys        | ggc<br>Gly<br>280 | ttc<br>Phe        | tat<br>Tyr        | ccc<br>Pro        | agc<br>Ser        | gac<br>Asp<br>285 | atc<br>Ile        | gcc<br>Ala        | gtg<br>Val        | 864 |
| gag<br>Glu<br>290 | tgg<br>Trp       | gag<br>Glu        | agc<br>Ser        | aat<br>Asn        | ggg<br>Gly        | cag<br>Gln<br>295 | ccg<br>Pro        | gag<br>Glu        | aac<br>Asn        | aac<br>Asn        | tac<br>Tyr<br>300 | aag<br>Lys        | acc<br>Thr        | acg<br>Thr        | cct<br>Pro        | 912 |

## pctfr2009051343-seq1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| ccc | gtg | ctg | gac | tcc | gac | ggc | tcc | ttc | ttc | ctc | tac | agc | aag | ctc | acc | 960  |
| Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr |      |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| gtg | gac | aag | agc | agg | tgg | cag | cag | ggg | aac | gtc | ttc | tca | tgc | tcc | gtg | 1008 |
| Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| atg | cat | gag | gct | ctg | cac | aac | cac | tac | acg | cag | aag | agc | ctc | tcc | ctg | 1056 |
| Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| tct | ccg | ggg | tga |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1068 |
| Ser | Pro | Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|     |     | 355 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |

<210> 114  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 114

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

249

pctfr2009051343-seq1

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
210 215 220

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
225 230 235 240

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
245 250 255

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
260 265 270

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

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
290 295 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
305 310 315 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
325 330 335

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
340 345 350

Ser Pro Gly  
355

<210> 115  
<211> 1188  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1188)

<400> 115  
atg cgg ctg ctg ctg gcc ctg ttg ggg gtc ctg ctg agt gtg cct ggg 48  
Met Arg Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Ser Val Pro Gly  
1 5 10 15

cct cca gtc ttg tcc ctg gag gcc tct gag gaa gtg gag ctt gag ccc 96  
Pro Pro Val Leu Ser Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro  
20 25 30

aac gct gtg ggc agc atc cgt tat aac tac ctg cta gat gtg ctg gag 144  
Asn Ala Val Gly Ser Ile Arg Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp Val Leu Glu  
35 40 45

cgg tcc ccg cac cgg ccc atc ctg cag gcc ggg ctc ccg gcc aac acc 192  
Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Thr  
50 55 60

aca gcc gtg gtg ggc agc gac gtg gag ctg ctg tgc aag gtg tac agc 240  
Thr Ala Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu Leu Cys Lys Val Tyr Ser  
65 70 75 80

gat gcc cag ccc cac atc cag tgg ctg aag cac atc gtc atc aac ggc 288  
Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val Ile Asn Gly  
85 90 95

250

pctfr2009051343-seq1

| 85  |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |  |  |  |  |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|------|
| agc | agc | ttc | gga | gcc | gac | ggc | ttc | ccc | tat | gtg | caa | gtc | cta | aag | act |  |  |  |  | 336  |
| Ser | Ser | Phe | Gly | Ala | Asp | Gly | Phe | Pro | Tyr | Val | Gln | Val | Leu | Lys | Thr |  |  |  |  |      |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |  |  |      |
| gca | gac | atc | aat | agc | tca | gag | gtg | gag | gtc | ctg | tac | ctg | cgg | aac | gtg |  |  |  |  | 384  |
| Ala | Asp | Ile | Asn | Ser | Ser | Glu | Val | Glu | Val | Leu | Tyr | Leu | Arg | Asn | Val |  |  |  |  |      |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |  |      |
| tca | gcc | gag | gac | gca | ggc | gag | tac | acc | tgc | ctc | gca | ggc | aat | tcc | atc |  |  |  |  | 432  |
| Ser | Ala | Glu | Asp | Ala | Gly | Glu | Tyr | Thr | Cys | Leu | Ala | Gly | Asn | Ser | Ile |  |  |  |  |      |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |  |  |      |
| ggc | ctc | tcc | tac | cag | tct | gcc | tgg | ctc | acg | gtg | ctg | cca | gag | gag | gac |  |  |  |  | 480  |
| Gly | Leu | Ser | Tyr | Gln | Ser | Ala | Trp | Leu | Thr | Val | Leu | Pro | Glu | Glu | Asp |  |  |  |  |      |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |  |  |      |
| ccc | aca | tgg | acc | gca | gca | gca | ccc | gag | gcc | aaa | act | cac | aca | tgc | cca |  |  |  |  | 528  |
| Pro | Thr | Trp | Thr | Ala | Ala | Ala | Pro | Glu | Ala | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro |  |  |  |  |      |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |  |  |  |  |      |
| ccg | tgc | cca | gca | cct | gaa | ctc | ctg | ggg | gga | ccg | tca | gtc | ttc | ctc | ttc |  |  |  |  | 576  |
| Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe |  |  |  |  |      |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |  |  |      |
| ccc | cca | aaa | ccc | aag | gac | acc | ctc | atg | atc | tcc | cgg | acc | cct | gag | gtc |  |  |  |  | 624  |
| Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val |  |  |  |  |      |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |  |      |
| aca | tgc | gtg | gtg | gtg | gac | gtg | agc | cac | gaa | gac | cct | gag | gtc | aag | ttc |  |  |  |  | 672  |
| Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe |  |  |  |  |      |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |  |  |      |
| aac | tgg | tac | gtg | gac | ggc | gtg | gag | gtg | cat | aat | gcc | aag | aca | aag | ccg |  |  |  |  | 720  |
| Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro |  |  |  |  |      |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |  |  |      |
| cgg | gag | gag | cag | tac | aac | agc | acg | tac | cgt | gtg | gtc | agc | gtc | ctc | acc |  |  |  |  | 768  |
| Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr |  |  |  |  |      |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |  |  |      |
| gtc | ctg | cac | cag | gac | tgg | ctg | aat | ggc | aag | gag | tac | aag | tgc | aag | gtc |  |  |  |  | 816  |
| Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val |  |  |  |  |      |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |  |  |      |
| tcc | aac | aaa | gcc | ctc | cca | gcc | ccc | atc | gag | aaa | acc | atc | tcc | aaa | gcc |  |  |  |  | 864  |
| Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala |  |  |  |  |      |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |  |  |      |
| aaa | ggg | cag | ccc | cga | gaa | cca | cag | gtg | tac | acc | ctg | ccc | cca | tcc | cgg |  |  |  |  | 912  |
| Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg |  |  |  |  |      |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |  |  |      |
| gat | gag | ctg | acc | aag | aac | cag | gtc | agc | ctg | acc | tgc | ctg | gtc | aaa | ggc |  |  |  |  | 960  |
| Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly |  |  |  |  |      |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     |     |     | 320 |  |  |  |  |      |
| ttc | tat | ccc | agc | gac | atc | gcc | gtg | gag | tgg | gag | agc | aat | ggg | cag | ccg |  |  |  |  | 1008 |
| Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro |  |  |  |  |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |  |  |      |
| gag | aac | aac | tac | aag | acc | acg | cct | ccc | gtg | ctg | gac | tcc | gac | ggc | tcc |  |  |  |  | 1056 |
| Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser |  |  |  |  |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |  |  |      |
| ttc | ttc | ctc | tac | agc | aag | ctc | acc | gtg | gac | aag | agc | agg | tgg | cag | cag |  |  |  |  | 1104 |
| Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln |  |  |  |  |      |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |  |  |      |
| ggg | aac | gtc | ttc | tca | tgc | tcc | gtg | atg | cat | gag | gct | ctg | cac | aac | cac |  |  |  |  | 1152 |
| Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His |  |  |  |  |      |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |  |  |      |
| tac | acg | cag | aag | agc | ctc | tcc | ctg | tct | ccg | ggc | tga |     |     |     |     |  |  |  |  | 1188 |

251

pctfr2009051343-seq1

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
385 390 395

<210> 116  
<211> 395  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 116

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

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

Asn Ala Val Gly Ser Ile Arg Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp Val Leu Glu  
35 40 45

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

Thr Ala Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu Leu Cys Lys Val Tyr Ser  
65 70 75 80

Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val Ile Asn Gly  
85 90 95

Ser Ser Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val Leu Lys Thr  
100 105 110

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

Ser Ala Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile  
130 135 140

Gly Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Glu Glu Asp  
145 150 155 160

Pro Thr Trp Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Lys Thr His Thr Cys Pro  
165 170 175

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
180 185 190

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
195 200 205

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
210 215 220

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
225 230 235 240

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
245 250 255

pctfr2009051343-seq1  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 260 265 270

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 275 280 285

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 290 295 300

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 305 310 315 320

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 325 330 335

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 340 345 350

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 355 360 365

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 370 375 380

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 385 390 395

<210> 117  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 117

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

253

pctfr2009051343-seq1  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2009/051343

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C12N15/13 C12N5/18 A61K39/395 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 2008/052796 A (U3 PHARMA AG [DE]; BANGE JOHANNES [DE]; NIEWOEHNER JENS [DE]; AUS DEM) 8 May 2008 (2008-05-08)<br>cited in the application<br>examples | 1-2                   |
| X         | WO 2008/052798 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]; ULLRICH AXEL [DE]; BERGER HANS-JUERGEN []) 8 May 2008 (2008-05-08)<br>page 25, paragraph DERNIER         | 1-2                   |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 March 2010

Date of mailing of the international search report

17/03/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vadot, Pierre

255

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2009/051343

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| W0 2008052796 A                           | 08-05-2008          | AU 2007315211 A1           | 08-05-2008          |
|                                           |                     | CA 2668295 A1              | 08-05-2008          |
|                                           |                     | EP 2094733 A1              | 02-09-2009          |
| W0 2008052798 A                           | 08-05-2008          | AU 2007315213 A1           | 08-05-2008          |
|                                           |                     | CA 2668027 A1              | 08-05-2008          |
|                                           |                     | EP 1918376 A1              | 07-05-2008          |
|                                           |                     | EP 2092066 A2              | 26-08-2009          |

256

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/051343

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                      |                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b><br>INV. C07K16/28 C12N15/13 C12N5/18 A61K39/395 A61P35/00                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                      |                                                                                    |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                      |                                                                                    |
| <b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b><br>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)<br>C07K                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                      |                                                                                    |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                      |                                                                                    |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)<br>EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                      |                                                                                    |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                      |                                                                                    |
| Catégorie*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                       | no. des revendications visées                                                      |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2008/052796 A (U3 PHARMA AG [DE]; BANGE JOHANNES [DE]; NIEWOEHNER JENS [DE]; AUS DEM) 8 mai 2008 (2008-05-08)<br>cité dans la demande<br>exemples | 1-2                                                                                |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2008/052798 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]; ULLRICH AXEL [DE]; BERGER HANS-JUERGEN [ ]) 8 mai 2008 (2008-05-08)<br>page 25, alinéa DERNIER       | 1-2                                                                                |
| <input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                      |                                                                                    |
| <b>* Catégories spéciales de documents cités:</b><br>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent<br>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date<br>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)<br>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens<br>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée<br>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention<br>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément<br>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier<br>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets |                                                                                                                                                      |                                                                                    |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée<br><br>10 mars 2010                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                      | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale<br><br>17/03/2010 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale<br>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                      | Fonctionnaire autorisé<br><br>Vadot, Pierre                                        |

257

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/051343

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| WO 2008052796 A                                 | 08-05-2008             | AU 2007315211 A1                        | 08-05-2008             |
|                                                 |                        | CA 2668295 A1                           | 08-05-2008             |
|                                                 |                        | EP 2094733 A1                           | 02-09-2009             |
| WO 2008052798 A                                 | 08-05-2008             | AU 2007315213 A1                        | 08-05-2008             |
|                                                 |                        | CA 2668027 A1                           | 08-05-2008             |
|                                                 |                        | EP 1918376 A1                           | 07-05-2008             |
|                                                 |                        | EP 2092066 A2                           | 26-08-2009             |



**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**  
**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**  
**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN**  
**SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT**

|                                                                  |                                                       |                  |      |                     |                                   |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------|------|---------------------|-----------------------------------|
| (21) N° de solicitud:                                            |                                                       |                  |      | (51) Int Cl:        | <b>C07K 016/028</b>               |
| 22) Fecha de solicitud:                                          |                                                       |                  |      | (71) Solicitante(s) | <b>SANOFI-AVENTIS</b>             |
| (30) Prioridad                                                   | (31)                                                  | <b>Prioridad</b> | (32) | <b>Fecha</b>        | (33) <b>País</b>                  |
|                                                                  |                                                       | <b>08/03888</b>  |      | <b>08/07/2008</b>   | <b>FR</b>                         |
|                                                                  |                                                       |                  |      | (72) Inventor(es)   | <b>NICOLAS BAURIN<br/>Y OTROS</b> |
|                                                                  |                                                       |                  |      | (74) Apoderado:     | <b>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</b>      |
| (85)                                                             | Fecha limite inicio fase nacional:                    |                  |      | (87)                | Publicación internacional         |
| (86)                                                             | Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT |                  |      | Fecha:              | 14/01/2010                        |
|                                                                  | Fecha de presentación de la solicitud:                |                  |      | N° publicación:     | <b>WO 2010/004204 A3</b>          |
|                                                                  | No. de solicitud PCT/FR2009/051343                    |                  |      |                     |                                   |
| (54) Título: <b>ANTAGONISTAS ESPECÍFICOS DEL RECEPTOR FGF-R4</b> |                                                       |                  |      |                     |                                   |

secuencia SEC ID N°: 5, 76, 86, 96 ó 106.

- 1.** Antagonista del receptor FGF-R4, caracterizado por que es un anticuerpo que se une de manera específica a FGF-R4
- 2.** Antagonista según la reivindicación 1, caracterizado por que se une al dominio D2-D3 del receptor FGF-R4.
- 3.** Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que se une al dominio D2 del receptor FGF-R4.
- 4.** Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que tiene un  $K_D$  con respecto al receptor FGF-R4 determinado por la técnica Resonancia de Plasmón de Superficie (Biacore) inferior a  $10E-8$  M.
- 5.** Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es activo a la vez contra FGF-R4 humano y FGF-R4 murino.
- 6.** Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es un anticuerpo y comprende al menos una CDR que presenta una secuencia idéntica a una de las secuencias SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ó 110.
- 7.** Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es un anticuerpo y comprende las CDR de secuencia SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, 13 y 14 ó 73, 74, 75, 78, 79 y 80 ó 83, 84, 85, 88, 89 y 90 ó 93, 94, 95, 98, 99 y 100 ó 103, 104, 105, 108, 109 y 110 o una de las CDR puede diferir en uno a dos aminoácidos con respecto a al menos una de las secuencias citadas anteriormente, siempre que el anticuerpo mantenga su especificidad de unión.
- 8.** Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es un anticuerpo cuya parte variable de su cadena pesada comprende una secuencia nucleotídica que presenta al menos el 80% de identidad con la
- 9.** Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es un anticuerpo cuya parte variable de su cadena ligera comprende una secuencia nucleotídica que presenta al menos el 80% de identidad con la secuencia SEC ID N°: 7, 71, 81, 91 ó 101.
- 10.** Antagonista según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es un anticuerpo y por que su secuencia comprende las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 2 y 4 ó 6 y 8 ó 72 y 77 u 82 y 87 ó 92 y 97 ó 102 y 107.
- 11.** Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que induce una inhibición de las vías de señalización celular controladas por FGF-R4..
- 12.** Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que induce una inhibición de la angiogénesis.
- 13.** Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que induce una inhibición de la proliferación celular tumoral.
- 14.** Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que su afinidad por FGF-R4 es 10 veces superior a su afinidad por los otros receptores de FGF.
- 15.** Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que es un anticuerpo humanizado.
- 16.** Antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que es un anticuerpo humano.
- 17.** Antagonista según la reivindicación 15, caracterizado por que comprende una cadena variable ligera que presenta al menos el 80% de identidad con una de las secuencias polipeptídicas SEC ID N° 30 ó 32.

259

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RIY : 30017-00000

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 11 - 135  
FECHA : ENERO 3 DE 2011

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-001540- -00000-0000

Fecha: 2011-01-07 11:11:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 262

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | Nº. PAGO | FECHA PGO  | Vº. PAGO     |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|--------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 13927244 | 03/01/2011 | 6,351,000.00 |

\*\*\*\*\* C O N C E P T O \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                           | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-09 | OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I     |                |
|       |             | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 5,000.00       |
|       |             | TOTAL :                            | 5,000.00       |

BOG: TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE DATA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

020: 147+5 -841-163-0.

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA  
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER  
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

260

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-001540-00000-0000

Fecha: 2011-01-07 11:11:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 262

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

PEDIDO OFICIAL DE CAJA : 11 - 371  
FECHA : ENERO 5 DE 2011

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | CANAL          | CUENTA    | Nº. VOUCHER | FECHA PAGO | VAL. PAGO     |
|-------------------|--------------|----------------|-----------|-------------|------------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | CANAL DE PAGOS | 063754327 | 119377308   | 03/01/2010 | 42,924,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | CONCEPTO                          | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES           |                |
| 1     | TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 571,000.00     |
|       | TOTAL :                           | 571,000.00     |

SUN: QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

COLO: 14775-841-163-0

261

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-001540- -00000-0000

Fecha: 2011-01-07 11:11:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 262

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 300176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 11 - 372  
FECHA : ENERO 3 DE 2011

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE         | TIPO PAGO    | CUENTA                        | MON. PAGO | FECHA PGO  | VAL. PAGO     |
|---------------------|--------------|-------------------------------|-----------|------------|---------------|
| CABELLER ASSOCIADOS | CONSIGNACION | BANCA DE OCCIDENTAL 062154387 | 139233305 | 03/01/2010 | 49,824,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. RECIBO              | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 571,000.00     |
|                           | TOTAL :                             | 571,000.00     |

SUM: QUINIENTOS SETENTA Y UNO MIL PESOS.

REPRODUCCION:

COLO: 14775-841-163-0

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

262

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-001540-00000-0000

Fecha: 2011-01-07 11:11:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 379 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 262

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

N.I. : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 1.1 - 4.4.1  
FECHA : 3 ENERO 3 DE 2011

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VAL. PAGO     |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CANELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 052750327 | 109277305 | 03/01/2010 | 47,214,000.00 |

\*\*\*\*\* D E B E R T O \*\*\*\*\*

| CANT. REVISADO                               | CANCELADO                          | TOTAL CONCEPTO |
|----------------------------------------------|------------------------------------|----------------|
| 1 50005-02-89 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I | 00 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 30,000.00      |
|                                              | TOTAL :                            | 20,000.00      |

MON: VEINTE MIL PESOS

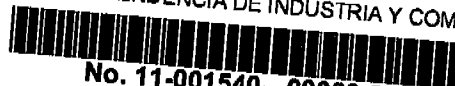
RESPONSABLE

COLO: 14775-841-1630

RECIBO DE CADA APLICADO AL EXCEDENTE No. \_\_\_\_\_

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

11



No. 11-001540-00000-0000

Fecha: 2011-01-07 11:11:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 262

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ☒ Indicación que se solicita una patente.
- ☒ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,  
2020



Doctor(a)  
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA  
Apoderado(a) y/o Representante de  
SANOFI-AVENTIS

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 11 001540         |
|            | Solicitud internacional    | PCT/FR2009/051343 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 08/02/2011        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 379               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 |                   |

03930

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Con respecto al resumen y de conformidad con lo dispuesto en el artículo 31 D. 486 en el cual se establece que el resumen consiste en una síntesis de la divulgación técnica contenida en la solicitud de patente, debe adecuar el resumen a los dispuesto en dicha norma, teniendo en cuenta que el extracto permitirá precisar el objeto de la invención, sus elementos característicos y el campo de aplicación.

Anexo al presente requerimiento se sugieren los lineamientos principales para la presentación adecuada del resumen.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

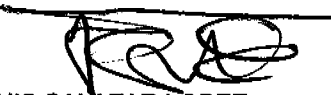
Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 11 001540

  
**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

  
JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ  
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 10.3 MAR. 2011  
adpa11

## **ANEXO INFORMATIVO**

### **Presentación**

El resumen debe ser claro y tan conciso como lo permita la descripción. No debe exceder de 250 palabras, debiendo contener preferentemente de 50 a 150 palabras y puede incluir fórmulas químicas y matemáticas, cuadros o figuras, en tamaño 12x12.

### **Contenido**

El resumen debe tratar esencialmente de lo que es nuevo y aporta la invención al estado de la técnica al que pertenece. De esta manera, si la naturaleza de la invención es la modificación de un aparato, o la presentación de un procedimiento, producto o compuesto, el resumen debe enfocarse hacia la descripción técnica de la modificación.

En el caso de que el documento de patente reivindique un producto, particularmente un compuesto o componente y también contenga un procedimiento o método de preparación, éste también debe ser incluido en el resumen.

En lo que concierne a los compuestos o composiciones químicas, el resumen debe contener la naturaleza química del compuesto o de la composición, así como el campo de aplicación. El resumen debe indicar la fórmula química que mejor caracterice la invención.

En lo que respecta a los procedimientos, el resumen debe explicar el tipo de reacción, los reactivos y las condiciones para llevar a cabo el procedimiento.

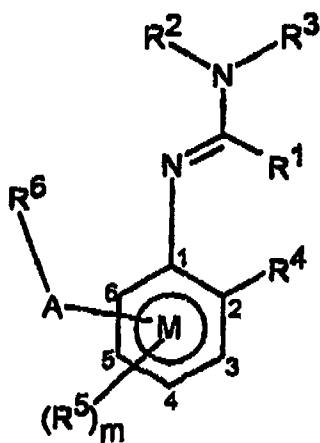
El resumen no debe contener declaraciones relativas a las ventajas asociadas a la invención.

### Ejemplo:

**Objeto de la Invención:** Derivados de fenilamidina de fórmula (I) con aplicación como antifúngicos.

**Características de la Invención:** Compuestos fungicidas de fórmula (I) y sales donde: R1 es hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo, carbocíclico o heterocíclico cada uno de los cuales se encuentra sustituido; R2 y R3 son iguales o diferentes y se eligen entre: ciano, acilo, -ORa o -OSRa donde Ra es alquilo, alquenoilo, alquinilo, carbociclilo o heterociclilo, o bien, R2 y R3 forman conjuntamente con el átomo al cual se unen un anillo que puede sustituirse por R4 que es alquilo, alquenoilo, alquinilo, carbocíclico o heterociclilo y que pueden sustituirse por hidroxilo, mercapto, azido, nitro, halógeno, ciano, acilo. R5 es igual a la definición contemplada para R4, R6 es un anillo carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido y A es un grupo enlazante o AR6 y AR5 forman un anillo fusionado con el anillo de benceno M.

### Figura característica:



**Campo de aplicación:** Producción de agentes antifúngicos con aplicación farmacéutica