

Señores
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Bogotá, D.C.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-008131-00007-0000

Fecha: 2008-07-08 12:29:59 Dep. 2020 NUEGREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 180

Re.: Código 011-378-444
Expediente No. 05-8.131
Fase Nacional de Solicitud
de Patente PCT
THE KENNETH S. WARREN
INSTITUTE, INC.

En relación con el expediente de la referencia y dando cumplimiento a la última providencia recaída sobre este asunto por medio del presente escrito me permito manifestarles lo siguiente:

1. La sociedad solicitante propone modificar la solicitud arriba identificada de manera que las secuencias de eritropoyetina (EPO) en el listado de secuencias guarden concordancia con la descripción. La descripción tal como fue presentada (Solicitud Internacional No. PCT/US2003/020964, publicada como Publicación Internacional No. WO 2004/003176) enseña que los primeros 27 residuos de aminoácidos de la EPO de longitud total componen la secuencia líder (véase página 87, línea 16-22). Era bien conocido del estado de la técnica que la EPO madura es producida por la eliminación de esta secuencia líder de 27 aminoácidos. Véase, *páginaej.*, Jacobs K *et al* línea 1985. "Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin", *Nature* 313(6005):806-810.

En la descripción se hace referencia a las posiciones de aminoácido de la EPO por su posición en la EPO madura (es decir, la posición 1 en la proteína madura es la posición 28 de la proteína de longitud completa). Por ejemplo, en la página 4, línea 21-22, el péptido EPO TKVNFYAW es designado como "aminoácidos 44-51 de la eritropoyetina humana nativa; SEQ ID NO: 2". En la página 6, línea 16, se enseña que

294
295
296

la SEQ ID NO: 2 corresponde a las posiciones 44 a 51 de la SEQ ID NO: 10. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos TKVNFYAW está presente en las posiciones 71 a 78 de la SEQ ID NO: 10 en el listado de secuencias.

Con el fin de corregir esta evidente inconsistencia, se presenta el Listado Sustituto de Secuencias que se adjuntan, revisado de manera que las secuencia de aminoácidos representadas por las SEQ ID Nos.: 4, 5, 10, y 15-119 carecen de la secuencia líder. La secuencia de longitud completa de la EPO, que originalmente se identifica por el identificador de secuencia SEQ ID NO: 10, se identifica como SEQ ID NO: 213 en el Listado Sustituto de Secuencias. En consecuencia, se considera que el Listado Sustituto de Secuencias no añade nuevo asunto.

2. Se efectúan igualmente las siguientes modificaciones menores a la descripción de manera que (i) guarde concordancia con el Listado Sustituto de Secuencias y (ii) corregir errores tipográficos.

- Se modifica el párrafo de la página 6, línea 9-13 como sigue:

En una versión de la invención, la citocina recombinante protectora tisular comprende uno o más residuos alterados de aminoácidos entre las posiciones 11 a 15 de la SEQ ID NO: 10 [SEQ ID NO: 1], posiciones 44 a 51 de la SEQ ID NO: 10 [SEQ ID NO: 2], posiciones 100-108 de la SEQ ID NO: 10 [SEQ ID NO: 3], o posiciones 146-151 de la SEQ ID NO: 10 [SEQ ID NO: 4].

El respaldo para esta modificación se puede encontrar en la descripción (versión en inglés) en la página 4, línea 20-26; página 4, línea 33 a página 5, línea 1; página 7, línea 24 a página 8, línea 2; página 40, línea 1-5; página 47, línea 18-19; página 48, línea 1-2; y página 90, línea 1-6.

- Se modifica la descripción en la página 9, línea 27 y la página 41, línea 23 reemplazando el texto "KW00-009C02-US" por "10165-017-999 (antes, KW00-002B02-US)."
- Se modifica la descripción en la página 14, línea 28 como sigue:

2,4,6-trinitrobencenosulfonato de sodio u otra sal del mismo.

- Se modifica la descripción en la página 21, línea 3-14 como sigue:

La invención también contempla el uso de una molécula en asociación con una citocina recombinante protectora tisular como se describió arriba, que carece por lo menos de una actividad eritropoyética seleccionada de entre el grupo compuesto por hematocrito creciente, acción vasoactiva (vasoconstricción / vasodilatación), plaquetas hiperactivadoras, actividades procoagulantes, y aumento de la producción de trombocitos, para la preparación de una composición farmacéutica para transportar una molécula por vía de transcitosis a través de una barrera de células endoteliales. En una versión, la asociación es un enlace covalente lábil, un enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de unión para la mencionada molécula. En otra versión, la molécula es una hormona agonista o antagonista del receptor, un factor neurotrófico, un agente antimicrobiano, un radiofármaco, un oligonucleótido anti-sentido, un anticuerpo, un inmunosupresor, un colorante, o un marcador o un medicamento contra el cáncer.

El respaldo para esta modificación se puede encontrar en la descripción (versión en inglés) en la página 2, línea 15-20; página 11, línea 18-22; página 20, línea 16 a página 21, línea 7; página 21, línea 4-20; página 24, línea 30 a página 25, línea 27; página 82, línea 13-16; página 87, línea 8-13; Ejemplo 3, *páginaej.*, en la página 90, línea 8-10; página 101, línea 13-17; página 101, línea 26 a página 102, línea 15; Ejemplo 4, *páginaej.*, en la página 102, línea 18-29; Ejemplo 5, *páginaej.*, en la página 110, línea 12-14; Ejemplo 6, en las páginas 110-112; Ejemplos 8-11, comenzando en la página 113; Ejemplo 12, *páginaej.*, en la página 117, línea 13 a página 118, línea 2; Ejemplo 13, *páginaej.*, en la página 119, línea 30-31; y página 120, línea 27-28.

- Se reemplaza la oración en la página 38, línea 8-13 con la siguiente oración modificada:

Las citocinas recombinantes protectoras de tejidos de la invención incluyen muteínas de eritropoyetina, que mantienen actividad eritropoyética parcial o completa. La eritropoyetina es una hormona glucoproteica que en los seres humanos tiene un peso molecular de alrededor de 34 kDa. La proteína madura comprende 165 aminoácidos (SEQ ID NO: 10), y los residuos de glucosilo comprenden cerca de 40% del peso de la molécula.

- Se reemplaza la oración en la página 46, línea 19-24 con la siguiente oración modificada:

Por ejemplo, "eritropoyetina humana S100E" o "citocina recombinante protectora tisular S100E" se refiere a una molécula de eritropoyetina humana en la cual, en el aminoácido 100 de la eritropoyetina madura, una serina ha sido cambiada a ácido glutámico. Tales muteínas útiles para la práctica de la presente invención incluyen pero no se limitan a la eritropoyetina humana con por lo menos uno de los siguientes cambios de aminoácido:

- Se reemplazan las dos oraciones en la página 88, línea 5-9 por la siguiente oración modificada:

La base 418 en la secuencia codificadora (comenzando la numeración desde el ATG) era C en vez de G, cambiando el aminoácido 140 en la secuencia de la EPO de longitud completa (*es decir*, SEQ ID NO: 213) comenzando desde la primera metionina de Arg a Gly. Ésta, sin embargo, es una variación normal de la secuencia original y se encuentra presente en la mayoría de las formas de eritropoyetina.

- Se reemplazan los tres párrafos de la página 88, línea 23-28 con los siguientes tres párrafos modificados:

Este cADN codifica para la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina de longitud completa, que se presenta a continuación:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLE
RYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKR
MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPL
QLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRT
ITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID
NO: 213).

Los primeros 27 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 213 comprenden una secuencia líder.

- Se modifica la descripción para corregir el encabezado de la sección de la página 114, línea 11:

6.13. EJEMPLO 13: EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DE LA ERITROPOYETINA

- Se modifica la descripción para corregir el encabezado de la sección de la página 118, línea 14:

**6.14. EJEMPLO 14: EXAMEN DE MUERTE CELULAR
INDUCIDA POR NMDA**

- Por último, proponemos hacer las siguientes modificaciones a la descripción:

En la página 47, línea 11:

S146A, N147K, N147A, F148Y, F148A, L149A, R150A,
R150E, G151A,

En la página 47, línea 16:

A160S, C161A, o R162A.

En la página 48, línea 14-15.

P42A, F48A, Y49A, T132A, I133A, T134A, N147A, F148A,
R150A, G151A, G158A,

La persona medianamente versada en la técnica sabrá que estos son errores tipográficos. Siguiendo las enseñanzas de la presente descripción (véase, *p.ej.*, la versión en inglés en página 47, línea 8-19; página 90, línea 1-7; y SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 213 en el Listado Sustituto de Secuencias anexo a la presente, es decir, EPO nativa de longitud completa), y teniendo conocimiento de la secuencia nativa publicada de la EPO (in, *páginaej.*, Jacobs K *et alínea*; Anexo C), la persona versada en la técnica sabrá que los aminoácidos nativos en las posiciones 148 y 160 de la EPO son F (fenilalanina) y A (alanina), respectivamente – no P (prolina) y C (cisteína). En consecuencia, la persona medianamente versada en la técnica sabrá que las muteínas a que se hace referencia en la presente descripción son F148A y A160S. Acompaño el documento que acredita la cesión de los inventores a la sociedad solicitante.

3. También se realizan modificaciones en las figuras, donde la Figura 3 fue presentada con la Solicitud Internacional PCT/US2003/020964, pero fue omitida en la publicación, WO 2004/003176 (publicada el 8 de enero de 2004). Como Anexo D aparecen los siguientes documentos que confirman que la Figura 3 estaba presente en la solicitud tal como fue presentada:

2008
299
300

- (1) Una copia de una Comunicación para casos en los cuales no se aplica otro formulario ("Comunicación"), enviada por correo por la Oficina Internacional de la WIPO el 17 de julio de 2007. La Comunicación dice que la Oficina Internacional ha caído en la cuenta de que omitió la página 3/37 de los dibujos de la Publicación Internacional No. WO 2004/003176 y que en consecuencia van a publicar una versión corregida de la Solicitud Internacional publicada; y
- (2) Una copia de la portada y la Figura 3 de WO 2004/003176 como fue nuevamente publicada el 23 de agosto de 2007.

Se presentan páginas de sustitución que contienen las siguientes correcciones a los dibujos:

- Plancha de dibujo 10/37: El panel inferior de la figura debe ser marcado como "FIG. 10."

La Figura 10 debe ser además corregida para completar el texto faltante: "n para CADA GRUPO es MAYOR O IGUAL A 4."

- Plancha de dibujo 12/37: El panel inferior de la figura debe ser marcado como "FIG. 13."
- Plancha de dibujo 16/37: en la Figura 17, el rótulo del eje de y en la gráfica debe decir "Amplitud (48,8 μ V/div)."
- Plancha de dibujo 24/37: El panel inferior debe ser marcado "FIG. 25C" (corregido de la FIG. 3C)
- Plancha de dibujo 29/37: El eje de x de la FIG. 30B debe ser rotulado con "-EPO" y "+EPO," como se indica en la copia anexa de esta plancha de dibujo.
- Plancha de dibujo 30/37: El panel inferior debe ser marcado "FIG. 32"

La barra situada más a la izquierda en la gráfica de la FIG. 32 debe ser marcada como "CONTROLES."

4. Se presenta de igual manera un nuevo capítulo reivindicatorio. Las reivindicaciones tal como fueron modificadas describen composiciones farmacéuticas que comprenden muteínas de eritropoyetinas recombinantes (también descritas aquí como "muteínas de EPO") generadas por una alteración de la EPO de tipo silvestre (SEQ ID NO: 10), de manera que las muteínas resultantes tienen una actividad eritropoyética disminuida pero todavía retienen su funcionalidad protectora tisular. Las reivindicaciones modificadas proporcionan pruebas específicas reconocidas por el estado de la técnica que la persona versada en la técnica puede usar para confirmar que las muteínas de la EPO se reducen en cuanto a su actividad eritropoyética pero todavía mantienen su actividad protectora tisular. En particular, las reivindicaciones exigen que las muteínas de la EPO tengan (i) un nivel reducido de actividad eritropoyética *in vivo* comparada con la eritropoyetina nativa según se determina por el bioanálisis del ratón policitémico exhipóxico y (ii) la actividad protectora tisular *in vivo* tal como se determinó por la prueba de oclusión de la arteria cerebral media o *in vitro* como se determinó por el examen P19. En consecuencia, las muteínas de la EPO mencionadas en las reivindicaciones modificadas se definen por propiedades estructurales y funcionales de manera que pueden ser fácilmente identificadas por la persona versada en la técnica.

El efecto técnico sorprendente de las muteínas de EPO reivindicadas es que estas muteínas retienen su actividad protectora tisular aunque su actividad eritropoyética está disminuida, lo cual hace que sean adecuadas para usarlas en composiciones farmacéuticas para proteger, mantener, intensificar o restablecer la función o viabilidad de las células, tejidos u órganos respondedores de mamíferos. Antes del descubrimiento hecho por los inventores de que muteínas de la EPO con actividad eritropoyética disminuida tienen actividad protectora tisular, no se había considerado hacer composiciones farmacéuticas que comprenden estas muteínas de la EPO, porque se pensaba que las EPO incapaces de estimular la producción de los glóbulos rojos fueron eran biológicamente inactivas.

300
301
302

5. Además se considera que el alcance completo de las reivindicaciones modificadas encuentra respaldo en la descripción. En particular, se puede encontrar respaldo experimental para las muteínas de la EPO con funcionalidad protectora tisular y actividad eritropoyética disminuida en los ejemplos de trabajo de la descripción tal como fue presentada en la páginas 87-128. La descripción proporciona unos métodos para hacer muteínas de la EPO y formas químicamente modificadas de las mismas. Con base en la presente revelación, sería rutinario para la persona versada en la técnica hacer las muteínas de EPO reivindicadas y las formas químicamente modificadas de las mismas, determinar si tienen actividad eritropoyética disminuida, y examinar su actividad protectora tisular, como lo exigen las reivindicaciones.

Por caso, el Ejemplo 3 que comienza en la página 87 enseña cómo hacer las muteínas K20A, K45A, K45D, K52A, K97A, S100E, K116A, R150E, R103E, K140A, K152A, K152W, K154A, las mutantes de combinación R14A/Y15A, N24K/N38K/N83K, A30N/H32T, R103E/L108S, K140A/K152A, K140A/K52A/K45A, K97A/K152A, K97A/K152A/K45A, K97A/K152A/K45A/K52A, K97A/K152A/K45A/K52A/K140A, K97A/K152A/K45A/K52A/K140A/K154A, una muteína con una delección de los aminoácidos 44 a 49, y cómo modificar aún más estas muteínas añadiendo un rótulo de histidina. Siguiendo las enseñanzas de los Ejemplos 4 y 5 comenzando en la página 99, la persona versada en la técnica habría sabido cómo hacer y examinar las muteínas que han sido sometidas a modificación química adicional, y los Ejemplos proporcionan técnicas para generar EPO químicamente modificadas y someterlas a pruebas *in vitro* e *in vivo* de protección tisular.

6. Las EPO modificadas se pueden someter a pruebas de actividad protectora tisular usando las determinaciones de los ejemplos comenzando por el Ejemplo 6 de la página 110 (prueba de intoxicación con agua, protección de corazón preparado para trasplante, protección de varios tejidos contra lesiones isquémicas, protección contra isquemia retiniana, restablecimiento de la función cognitiva luego de lesión cerebral, protección del cerebro contra daños debidos a exposición a kainato, y mediación de efectos antiinflamatorios en modelos animales). En particular, el Ejemplo 3, el Ejemplo 15 y el Ejemplo 16 muestran que las muteínas K45D y S100E y EPO químicamente

302
9/3

modificadas son protectoras celulares en diferentes determinaciones *in vitro*. Varias EPO químicamente modificadas mostradas en los Ejemplos 4 y 5 son neuroprotectoras *in vitro* y se sabe que protegen a las ratas del daño neurológico causado por isquemia focal; el Ejemplo 6 enseña que las EPO químicamente modificadas protegen a los ratones del daño neurológico inducido en una prueba de intoxicación con agua y el Ejemplo 11 muestra la protección de animales del daño neurológico causado por exposición a kainato. Los Ejemplos 12 y 13 muestran que la muteína S100E y varias EPO químicamente modificadas son protectoras en modelos animales de lesión de la médula espinal. El Ejemplo 14 muestra que las muteínas R130E y R150E reducen la Muerte celular inducida por NMDA. El Ejemplo 18 demuestra que las muteínas R103E, R150E, S100E, y S100E/K45D confirieron mayor protección contra la lesión ocular isquémica que la EPO recombinante de tipo silvestre. En consecuencia, la descripción proporciona amplia enseñanza de métodos para hacer muteínas de la EPO y formas químicamente modificadas de las mismas y examinar su funcionalidad protectora tisular, y proporciona datos experimentales para validar este concepto.

Por último, la descripción proporciona determinaciones para examinar si una forma particular de EPO tiene reducida su actividad eritropoyética. En la página 42, líneas 4-7 de la descripción se incorpora mediante referencia la publicación de Satake *et alínea*, 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1038:125-9, que describes una determinación bien establecida para determinar la eritropoyesis *in vivo*, el bioanálisis del ratón policitémico. Esta determinación también ha sido incluida en las reivindicaciones tal como fueron modificadas. Además, el Ejemplo 17 en las páginas 122-125 proporciona una determinación *in vitro* para examinar si una forma particular de EPO tiene reducida su actividad eritropoyética, y demuestra que, en efecto, una muteína (S100E) de la que se encontró que es protectora tisular tiene la actividad eritropoyética disminuida en esta determinación. En consecuencia, la descripción proporciona suficiente revelación para orientar a la persona versada en la técnica a hacer y examinar las muteínas reivindicadas, y las formas químicamente modificadas de las mismas, que son protectoras tisulares aunque tienen disminuida la

eritropoyesis. Según esto, los Solicitantes creen que la invención reivindicada no es teórica y general sino que está completamente respaldada por la revelación, en especial los ejemplos de trabajo, de la descripción.

Las figuras se describen en detalle en la descripción en las páginas 25-28 y en los ejemplos de trabajo en las páginas 86-124.

7. En respuesta a la objeción a las reivindicaciones 1 y 12-15 por falta de claridad porque supuestamente han sido llevadas a una superfamilia de citocinas, creemos que las modificaciones a las reivindicaciones obvian este rechazo. En particular, proponemos modificar la reivindicación 1 para que diga que las muteínas citocinas recombinantes protectoras tisulares comprenden "una muteína recombinante de la EPO de la SEQ ID NO: 10 con uno o más residuos alterados de aminoácidos". El respaldo para esta modificación se puede encontrar a lo largo de la descripción tal como fue presentada, *páginae.*, en las reivindicaciones 2-11 y 16-44 tal como fueron presentadas, las cuales citan ejemplos de numerosas especies de EPO que comprenden la SEQ ID NO: 10 con alteraciones (*entre otras*, sustituciones, deleciones, modificaciones químicas) de aminoácidos en varias posiciones; y en la versión en inglés página 4, línea 20 a página 5, línea 2; página 6, línea 14 a página 16, línea 4; página 47, línea 18 a página 55, línea 14; y, comenzando en la página 89, Ejemplo 3 (*p.ej.*, página 90, línea 1-6) a Ejemplo 18. Este requisito estructural, además de los requisitos funcionales añadidos a las reivindicaciones modificadas, a todas luces identifica el objeto reivindicado.

8. En respuesta a la objeción a las reivindicaciones originales 2-9 porque son indeterminadas, proponemos argumentar que las anteriores reivindicaciones 1-6, 51, y 63 (reivindicaciones 1-6, 42, y 53-58 tal como fueron modificadas) ahora citan la EPO de la SEQ ID NO: 10 con alteraciones de aminoácidos en posiciones específicas; estas EPO se identifican todavía más usando determinaciones bien establecidas de la actividad eritropoyética y la protectora tisular. En consecuencia, contrario a lo que sostiene el Examinador, las modificaciones no son indeterminadas. Con base en una lectura de la descripción y el Listado Sustituto de Secuencias, la

persona medianamente versada en la técnica podría entender fácilmente las modificaciones de la EPO abarcadas por las reivindicaciones. Además, la persona medianamente versada en la técnica sabría por la revelación de la descripción cómo determinar cuáles EPO modificadas tienen reducida su actividad eritropoyética y mantienen su actividad protectora tisular, como lo exigen las reivindicaciones modificadas.

9. Las muteínas de la EPO de las reivindicaciones tal como fueron modificadas comparten la característica estructural común de basarse en una EPO cuya secuencia se revela en la SEQ ID NO: 10, alterada mediante cambios de aminoácidos o modificaciones químicas de manera que la actividad protectora tisular se mantiene pero la actividad eritropoyética se reduce. Según esto, no creemos que la caracterización de las citocinas de las reivindicaciones tal como fueron modificadas sea especulativa, ya que la persona medianamente versada en la técnica, al leer la descripción, podría identificar fácilmente cuáles muteínas caen dentro del alcance de las reivindicaciones por parámetros estructurales y funcionales claramente definidos. Además, la descripción proporciona amplia enseñanza de métodos para hacer las diferentes modificaciones químicas citadas en las reivindicaciones (véanse, *p.ej.*, los Ejemplos 4 y 5 en las páginas 98-106) y proporciona un métodos que la persona versada en la técnica puede usar para examinar la actividad eritropoyética y actividad protectora tisular de estas EPO químicamente modificadas. Estas enseñanzas han sido aplicadas para generar formas químicamente modificadas de EPO que tienen funcionalidad protectora tisular. Véase, *p.ej.*, el Ejemplo 4 en la versión en inglés en la página 103, línea 20-32; página 106, 11. 15-25; página 107, línea 15-22; página 108, línea 16-23; Ejemplo 6 comenzando en la página 110; Ejemplo 12 comenzando en la página 115; y Ejemplo 16 en la página 125, línea 20-25.

10. Igualmente la sociedad solicitante respetuosamente disiente de la afirmación del Examinador de que los productos reivindicados no son claros porque se "originan en una forma indeterminada". La descripción proporciona amplias enseñanzas de métodos para generar los ácidos nucleicos (véase páginas 31-38), los vectores y las

305
175^o

células huésped (véase páginas 55-62), y las composiciones farmacéuticas (véase páginas 62-77) reivindicados. Según esto, con base en estas enseñanzas, y la modificación de las reivindicaciones de manera que citen las EPO modificadas de la SEQ ID NO: 10, las metas y límites de estas reivindicaciones estarían claras para la persona versada en la técnica. De conformidad con la recomendación del Examinador, se elimina el término "aislado" de la reivindicación original 45 (reivindicación 43 tal como fue modificada).

11. Con respecto a la objeción del punto 3.2 (5) las reivindicaciones tal como fueron modificadas aquí se limitan a muteínas recombinantes de la EPO, y por ello esta objeción queda superada.
12. En respuesta a la objeción del Examinador a las reivindicaciones originales 54-56 y 59-62 (según modificación, reivindicaciones 49, 50, y 61) para dirigirlos unos métodos de tratamiento, se considera que las reivindicaciones originales 54 y 55 (reivindicaciones modificadas 49 y 50) son patentables porque son llevadas a proteger, mantener o intensificar la viabilidad de células, tejidos, y órganos aislados (removidos) del organismo. Las reivindicaciones son llevadas un métodos para proteger, mantener, o intensificar la viabilidad de una célula, tejido u órgano *ex vivo*. Como tal, estas reivindicaciones no se dirigen a un método de tratamiento de un mamífero. La reivindicación original 59 (reivindicación modificada 61) se dirige a un método de facilitar el transporte de una molécula a través de una barrera de células endoteliales de un tejido u órgano aislado. Esta reivindicación no se dirige a un método de tratamiento de un mamífero sino a un método para llevar un fármaco a un tejido u órgano aislado.
13. Teniendo en cuenta lo dispuesto por el Consejo de Estado en sentencia proferida dentro del Expediente No. 7684 el 22 de Octubre de 2004 y acogida por esa Superintendencia mediante memorando interno de fecha 22 de Diciembre de 2004 dirigido a los funcionarios de la Delegatura de Propiedad Industrial, no se hace necesario acompañar comprobante de pago por concepto de modificación de la solicitud por cuanto el nuevo pliego reivindicatorio se presenta a instancia de la

307
11/30

6%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% en comparación con EPO recombinante.

La invención provee una citoquina recombinante protectora de tejido que le falta al menos una actividad seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocrito, vasoconstricción, hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos. La citoquina comprende al menos una actividad protectora celular de respuesta seleccionada del grupo consistente en proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano mamífero de respuesta.

En una versión de la invención, la citocina recombinante protectora tisular comprende uno o más residuos alterados de aminoácidos entre las posiciones 11 a 15 de la SEQ ID NO: 10 [SEQ ID NO: 1], posiciones 44 a 51 de la SEQ ID NO: 10 [SEQ ID NO: 2], posiciones 100-108 de la SEQ ID NO: 10 [SEQ ID NO: 3], o posiciones 146-151 de la SEQ ID NO: 10 [SEQ ID NO: 4].

En otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende un residuo alterado de amino ácido en una o más de las siguientes posiciones de SEQ ID NO:10; 7, 20, 21, 29, 33, 38, 42, 59, 63, 67, 70, 83, 96, 126, 142, 143, 152, 153, 155, 156 o 161.

Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende la secuencia amino ácida de SEQ ID NO:10 con uno o más de los siguientes cambios (a cada secuencia alterada se le ha asignado un número separado de identificación de secuencia); una alanina en el residuo 6 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:15); una alanina en el residuo 7 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:16); una serina en el residuo 7 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:17); una isoleucina en el residuo 10 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:18); una serina en el residuo 11 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:19); una alanina en el residuo 12 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:20); una alanina en el residuo 13 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:21); una alanina en el residuo 14 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:22); un ácido glutámico en el residuo 14 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:23); una glutamina en el residuo 14 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:24); una alanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:25); una fenilalanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:26); una isoleucina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:27); un ácido glutámico en el residuo 20 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:28); una alanina en el residuo 20 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:29); una alanina en el residuo 21 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:30); una lisina en el residuo 24 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:31); una serina en el residuo 29 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:32); una tirosina en el residuo 29 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:33); una asparagina en el residuo 30 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:34); una treonina en el residuo 32 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:35); una

308
15309

152, una alanina en el residuo 45 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:113); (ix) una alanina en el residuo 97, una alanina en el residuo 152, una alanina en el residuo 45, y una alanina en el residuo 52 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:114); (x) una analina en el residuo 97, una alanina en el residuo 152, una alanina en el residuo 45, una alanina en el residuo 52 y una alanina en el residuo 140 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:115); (xi) una alanina en el residuo 97, una alanina en el residuo 152, una alanina en el residuo 45, una alanina en el residuo 52, una alanina en el residuo 140, una alanina en el residuo 154, una lisina en el residuo 24, una lisina en el residuo 38, una lisina en el residuo 83, una lisina en residuo 24 y una alanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:116); (xii) una lisina en el residuo 24, una lisina en el residuo 38, y una lisina en el residuo 83 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:117); o (xiv) una lisina en el residuo 24 y una alanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:118). En una realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 10 con al menos una de las siguientes sustituciones de residuos de amino ácidos de SEQ ID Nos. 106-118.

Una realización de la invención se dirige a la citoquina recombinante protectora de tejido descrita arriba, que además comprende una modificación química de uno o más amino ácidos. En otra realización, la modificación química comprende alterar la carga de la citoquina recombinante protectora de tejido. Aún en otra realización, una carga positiva o negativa es agregada al residuo de amino ácido donde un residuo de amino ácido carado es modificado a un residuo no cargado.

Además, dichas citoquinas recombinantes protectoras de tejido pueden ser modificadas aún más mediante una modificación química de uno o más amino ácidos, tal como se describe en las siguientes solicitudes co-pendientes: solicitud PCT serie No. PCT/US01/49479, radicada el 28 de diciembre de 2001, Solicitud de Patente U.S. Serie No. 09/753,132 radicada el 29 de diciembre de 2000 y la Solicitud de Patente U.S. Caso No. 10165-017-999 (antes, KW00-002B02-US) radicada el 3 de julio de 2002, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad en este contexto. Estas otras modificaciones químicas pueden utilizarse para realzar las actividades protectoras de tejido de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido o para eliminar cualquier efecto que las citoquinas recombinantes protectoras de tejido puedan tener en la medula ósea. En otra realización, la modificación química adicional se provee para restaurar la solubilidad de la molécula que pueda reducirse como resultado de la modificación genética mencionada, tal como agregando químicamente una carga positiva o negativa a la molécula si un residuo de amino ácido cargado es cambiado por un residuo no cargado.

A modo de ejemplos no limitantes, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención incluyen muteína de eritropoyetina humana S100E (SEQ ID NO:5),

309
16310

- carbamoilasialeritropoyetina; N-epilson-carbamoilasialeritropoyetina; alfa-N-carbamoil, N-epilson-carbamoilasialeritropoyetina; alfa-N-carbamoilhiposialoeritropoyetina; N-epilson-carbamoilhiposialeritropoyetina; y alfa-N-carbamoil, N-epilson-carbamoilhiposialeritropoyetina; y alfa-N-carbamoil, N-epilson-carbamoilhiposialeritropoyetina. Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende al menos un residuo de lisina acilado. Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende al menos un residuo de lisina acilado. Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende al menos un residuo de lisina acilado. En una realización asociada, la citoquina acetilada comprende alfa-N-acetileritropoyetina; N-epilson-acetileritropoyetina; alfa-N-acetil, N-epilson-acetileritropoyetina; alfa-N-acetilasialoeritropoyetina; N-epilson-acetilasialoeritropoyetina; alfa-N-acetil, N-epilson-acetilasialoeritropoyetina; alfa-N-acetilhiposialoeritropoyetina; N-epilson-acetilhiposialoeritropoyetina; alfa-N-acetil, N-epilson-acetilhiposialeritropoyetina; alfa-N-acetilhipersialoeritropoyetina; N-epilson-acetilhipersialoeritropoyetina; alfa-N-acetil, y N-epilson-acetilhipersialoeritropoyetina.

- Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido tiene un residuo de lisina que está succinilado. En una realización asociada, la citoquina succinilada comprende alfa-N-succinileritropoyetina; N-epilson-succinileritropoyetina; alfa-N-succinil, N-epilson-succinileritropoyetina; alfa-N-succinilasialoeritropoyetina; n-epilson-succinilhiposialoeritropoyetina; alfa-N-succinil, N-epilson-succinilhiposialoeritropoyetina; alfa-N-succinilhipersialoeritropoyetina; N-epilson-succinilhipersialoeritropoyetina; y N-epilson-succinilpiersialoeritropoyetina.

- En una realización, al menos un residuo de tirosina de una citoquina recombinante protectora de tejido puede modificarse en una posición de anillo aromático por medio de un reactivo electrofilico, tal como por nitración o iodinación. En una realización asociada, la citoquina recombinante protectora de tejido que se describe arriba comprende al menos un residuo de lisina modificado por 2,4,6-trinitrobencenosulfonato de sodio u otra sal del mismo.

- En otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende al menos un residuo de tirosina nitrado o iodinado.

- En otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende un residuo de ácido aspártico o de ácido glutámico que es reaccionado con una carbodiimida seguida por reacción con una amina. En una realización asociada, la amina es glicinamida.

310
311

antisentido, un anticuerpo, inmunodepresivo, un colorante, un marcador o un fármaco anticancerígeno.

La invención también contempla el uso de una molécula en asociación con una citocina recombinante protectora tisular como se describió arriba, que carece por lo menos de una actividad eritropoyética seleccionada de entre el grupo compuesto por hematocrito creciente, acción vasoactiva (vasoconstricción / vasodilatación), plaquetas hiperactivadoras, actividades procoagulantes, y aumento de la producción de trombocitos, para la preparación de una composición farmacéutica para transportar una molécula por vía de transcitosis a través de una barrera de células endoteliales. En una versión, la asociación es un enlace covalente lábil, un enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de unión para la mencionada molécula. En otra versión, la molécula es una hormona agonista o antagonista del receptor, un factor neurotrófico, un agente antimicrobiano, un radiofármaco, un oligonucleótido anti-sentido, un anticuerpo, un inmunosupresor, un colorante, o un marcador o un medicamento contra el cáncer.

Por ello, la invención se dirige a un uso protector celular de cualquier citoquina recombinante protectora de tejido con una alteración en al menos un amino ácido de la eritropoyetina nativa opuesta, en donde la citoquina recombinante protectora de tejido tiene actividad protectora celular tal como se describe aquí. Dicha actividad protectora celular incluye, más no se limita a actividad neuroprotectora. La invención también se dirige al uso de cualquiera de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido antes mencionadas en el tratamiento de una célula, tejido u órgano de respuesta, en particular, para el tratamiento de una condición o enfermedad que involucre a dicha célula, tejido u órgano de respuesta. En este tipo de realización, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido tienen al menos una actividad seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocritos, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos. Una citoquina recombinante protectora de tejido según la invención mantiene preferiblemente la conformación tridimensional de la eritropoyetina nativa. La citoquina recombinante protectora de tejido puede tener o no tener actividad eritropoyética.

En una realización de la invención, la citoquina recombinante protectora de tejido es creada como una proteína recombinante con fusión del terminal N de su etiqueta His (residuos 6xHis). En algunas realizaciones, se pueden agregar secuencias adicionales de amino ácidos como espaciadores. En una realización específica, las muteínas de la citoquina recombinante protectora de tejido marcadas con histidina, según la invención, incluyen, más no se limitan a: K45D-6xHis y S100-6xHis.

En otro aspecto de la invención, cualquiera de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido puede utilizarse en la preparación de una composición farmacéutica

34
~~18~~ 312

En algunas realizaciones las moléculas de ácido nucléico de la invención se presentan como parte de moléculas de ácido nucléico que comprenden secuencias de ácido nucléico que contienen o codifican secuencias heterólogas (por ej: vector, vector de expresión o proteína de fusión).

5

5.2 CITOQUINAS RECOMBINANTES PROTECTORAS DE TEJIDO DE LA INVENCION

Las citocinas recombinantes protectoras de tejidos de la invención incluyen muteínas de eritropoyetina, que mantienen actividad eritropoyética parcial o completa. La eritropoyetina es una hormona glucoproteica que en los seres humanos tiene un peso molecular de alrededor de 34 kDa. La proteína madura comprende 165 aminoácidos (SEQ ID NO: 10), y los residuos de glucosilo comprenden cerca de 40% del peso de la molécula. Las formas de citoquina recombinante protectora de tejido útil en la práctica de la presente invención abarcan al menos un cambio de amino ácido en formas sintéticas y recombinantes que ocurren naturalmente, de las siguientes moléculas humanas y otras mamíferas asociadas con eritropoyetina: eritropoyetina, asialoeritropoyetina, eritropoyeina deglicosilada, análogos de eritropoyetina, miméticos de eritropoyetina, fragmentos de eritropoyetina, moléculas de eritropoyetina híbridas, moléculas de enlace receptor de eritropoyetina, agonistas de eritropoyetina, eritropoyetina renal, eritropoyeina cerebral, oligómeros y multímeros de lo mismo, y congéneres de lo mismo. Dichas citoquinas recombinantes protectoras de tejido equivalentes incluyen eritropoyetinas mutantes, las cuales pueden contener sustituciones, supresiones, incluidas supresiones internas, adiciones, incluidas adiciones que produzcan proteínas de fusión o sustituciones conservadoras de residuos de amino ácidos dentro y/o adyacentes a la secuencia de amino ácido, pero que resulten en un cambio "silente", en el sentido de que el cambio produzca una muteína de eritropoyetina o citoquina recombinante funcionalmente equivalente. En una realización preferida, la citoquina recombinante protectora de tejido es no-eritropoyética, es decir, le falta o exhibe una actividad eritropoyética reducida. Las sustituciones conservadoras de amino ácidos pueden hacerse con base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfifática de los residuos del caso. Por ejemplo, amino ácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofan y metionina; amino ácidos neutrales polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteina, tirosina, asparagina y glutamina; amino ácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y amino ácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Alternativamente, se pueden utilizar cambios de amino ácido no conservadores e inserciones y supresiones más grandes para crear citoquinas

312
313

= glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, agrupando serina y treonina por separado como alifático-hidroxil; (4) aromáticos = fenilalanina, tirosina, triptofan; (5) amidas = asparagina, glutamina; y (6) cisteína que contiene sulfuro y metionina. (Ver por ej: *Biochemistry*, 4 edición, por L. Stryer, WH Freeman y Co, 1995).

5 Alternativamente, se pueden introducir mutaciones aleatorias a lo largo o parte de la secuencia de codificación de una citoquina recombinante protectora de tejido, tal como por mutagenesis de saturación, y seleccionar los mutantes resultantes para actividad biológica con el fin de identificar mutantes que retengan actividad. Luego de la mutagenesis, la proteína codificada puede expresarse de manera recombinante y se puede
10 determinar la actividad de la citoquina recombinante protectora de tejido.

Además de las modificaciones de eritropoyetina ya mencionadas, la siguiente es una ampliación acerca de las varias citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención. Tal como se describe en Elliot et al., Boissel et al. y Wen et al., arriba mencionados, las siguientes muteínas de eritropoyetina son útiles para los fines descritos
15 y pueden proveerse en una composición farmacéutica para los métodos aquí descritos. En la nomenclatura de muteína que se utiliza aquí, el amino ácido cambiado se muestra primero con el código de una letra del amino ácido nativo, seguido por su posición en la molécula de eritropoyetina, seguido por el código de una letra del amino ácido de reemplazo. Por ejemplo, "eritropoyetina humana S100E" o "citocina recombinante
20 protectora tisular S100E" se refiere a una molécula de eritropoyetina humana en la cual, en el aminoácido 100 de la eritropoyetina madura, una serina ha sido cambiada a ácido glutámico. Tales muteínas útiles para la práctica de la presente invención incluyen pero no se limitan a la eritropoyetina humana con por lo menos uno de los siguientes cambios de aminoácido:

25 16A, C7A, C7S,

R101, V11S, L12A, E13A, R14A, R14E, R14Q, Y15A, Y15F, Y15I,

K20E, K20A,

E21A,

N24K, C29S, C29Y, A30N, H32T,

30 C33S, CEEY, N38K, N83K,

P42N,

P42A, D43A, T44I, K45D, K45A, V46A, N47A, F48I, F48A, Y49A, Y49S, supresión 44-49,

W51F, W51N, K52A,

35 Q59N,

E62T,

L67S,

L70A,

312 312
310

- D96R, K97A,
S100R, S100E, S100A, S100T, G101A, G101I, L102A, R103 A, R103E, S104A, S104I,
L105A, T106A, T106I, T107A, T107L, L108K, L108 A, L108S,
K116A,
5 S126A,
T132A,
I133A, T134A,
K140A,
F142I,
10 R143A,
S146A, N147K, N147A, F148Y, F148A, L149A, R150A, R150E, G151A,
K152A, K152W,
L153A,
K154A,
15 K155A, G158A,
A160S, C161A, o R162A.

En realizaciones preferidas, una muteína de eritropoyetina o una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención comprende una o más de las sustituciones anteriores. En otras realizaciones, la muteína de eritropoyetina u otra
20 citoquina recombinante protectora de tejido de la invención comprende una de las sustituciones anteriores o una combinación de las mismas.

En otra realización, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido, composiciones farmacéuticas, uso y métodos de tratamiento de la invención comprenden una o más de las sustituciones anteriores con la salvedad de que no comprenden una o
25 más de las siguientes sustituciones: I6A, C7A, K20A, P42A, D43A, K45D, K45A, F48A, Y49A, K52A, K49 A, S100E, R103A, K116A, T132A, I133A, K140A, N147K, N147A, R150A, R150E, G151A, K152A, K154A, G158A, C161A ni R162A. En una realización asociada de la invención, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido, composiciones farmacéuticas, uso y métodos de tratamiento de la invención comprenden
30 una o más de las sustituciones anteriores, con la salvedad de que no comprenden ninguna de las siguientes combinaciones de sustituciones: N24K/N38K/N83K o A30N /H32T.

En ciertas realizaciones, más de uno de los cambios de amino ácido anteriores pueden combinarse para hacer una muteína. Ejemplos de dichas combinaciones incluyen, más no se limitan a: K45D/S100E, A30N/H32T, K45D/R150E, R103E/L108S,
35 K140A/K52A, K140A/K52A/K45A, K97A/K152A, K97A/K152A/K45A, K97A/K152A/K45A/K52A, K97A/K152A/K45A/K52A/K140A, K97A/K152A/K45A/K52A/K140A/K154A, N24K/N38K/N83K y N24K/Y15A. En

2x 314
315

ciertas realizaciones, la muteína de la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no comprende una o más de las sustituciones múltiples anteriores. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención que comprende la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no comprende una o más de las anteriores sustituciones múltiples. En ciertas realizaciones, el uso y métodos de tratamiento de la invención que utilizan la muteína de citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no comprenden una o más de las anteriores sustituciones múltiples.

Algunas modificaciones o combinaciones pueden afectar la flexibilidad de una muteína de eritropoyetina de hacer el enlace a un receptor, tal como el receptor de eritropoyetina al cual se enlaza la eritropoyetina o la muteína de eritropoyetina. Ejemplos de dichas modificaciones o combinaciones de lo mismo útiles en las composiciones y métodos de la invención incluyen, más no se limitan a: K152W, R41A/Y15A, I6A, C7A, D43 A, P42A, F48A, Y49A, T132A, I133A, T134A, N147A, F148A, R150A, G151A, G158A,. Se sabe que las mutaciones correspondientes son perjudiciales para la hormona de crecimiento humano (Wells et al.). En ciertas realizaciones, la muteína de citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no comprende una o más de las sustituciones anteriores. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención que comprenden la muteína de citoquina recombinante protectora de tejido de la invención, no comprenden una o más de las sustituciones anteriores. En ciertas realizaciones, el uso y métodos de tratamiento de la invención que utiliza la muteína de citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no comprenden una o más de las sustituciones anteriores.

Además de una de las anteriores modificaciones de amino ácido, una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención también puede tener al menos ningún medio de ácido siálico, referida como muteína de asialoeritropoyetina. Preferiblemente, la muteína de asialoeritropoyetina de la invención es asialoeritropoyetina humana. En otras realizaciones, la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención puede tener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 13 residuos de ácido siálico. Se puede preparar mediante desialilación de una citoquina recombinante protectora de tejido utilizando sialidasa, tal como se describe en el empaque del fabricante para Sialydase A de ProZyme Inc., San Leandro, California. Típicamente, PROZYME® GLYCOPRO®, SIALYDASE A™ grado de secuencia (N-acetilneuraminato glicohidrolasa, EC 3.2.18) se utiliza para separar todos los residuos de ácido siálico que no se reduzcan, de carbohidratos complejos y glicoproteínas tal como eritropoyetina. También separan ácidos siálicos ramificados (enlazados a un residuo interno). Sialydase A es aislada de un clon de *Arthrobacter ureafaciens*.

315
316

La base 418 en la secuencia codificadora (comenzando la numeración desde el ATG) era C en vez de G, cambiando el aminoácido 140 en la secuencia de la EPO de longitud completa (*es decir*, SEQ ID NO: 213) comenzando desde la primera metionina de Arg a Gly. Ésta, sin embargo, es una variación normal de la secuencia original y se encuentra
5 presente en la mayoría de las formas de eritropoyetina.

La secuencia de codificación a partir del cADN de eritropoyetina es la siguiente:

ATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTG
CTGTGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCT
GTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGA
10 ATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGT
CCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTGCGGCAG
CAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGGAAGCTGTCCTGC
GGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCCTGCACTG
CATGTGGATAJIAGCCGTCAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGC
15 TCTGGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCT
CCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCGCAAACCTCTTCCGAGTCTACTCC
AATTCCTCCGGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAG
GGGACAGATGA (SEQ ID NO: 7).

Este cADN codifica para la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina de longitud
20 completa, que se presenta a continuación:

MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTG
CAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQAL
LVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITA
DTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 213).

25 Los primeros 27 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 213 comprenden una secuencia líder.

Los primeros 27 residuos del aminoácido de SEQ ID NO: 10 forman la secuencia principal.

30 Luego de introducir 6xHis en la terminal-C de la proteína humana EPO se diseñó un nuevo oligonucleótido para que las 6 histidinas se unieran al Asp 192 en la secuencia total, utilizando el siguiente oligonucleótido:

3'-6xms- bEPO 5'

GGTCTAGATCAATGGTGATGGTGATGATGGTCCCCTGTCCTGCAGGCG-3'(SEQ

recombinante protectora de tejido de la presente invención.

23 316 317

6.13. EJEMPLO 13: EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DE LA ERITROPOYETINA

5 ID-Estudios in-vivo:

MCAO en Ratas

Se obtuvieron ratas macho Cr1:CD(SD)BR con peso entre 250-280 g de Charles River, Calco, Italy. La cirugía se hizo en estas ratas de acuerdo con las enseñanzas de Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, LM., y Cerami, A. La eritropoyetina 2000 cruza la barrera cerebral sanguínea para protección contra lesiones cerebrales experimentales, *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10526-10531. En resumen, las ratas se anestesiaron con hidrato cloral (400 mg/kg-bw, intraperitonealmente (i.p.)), se visualizaron las arterias carótidas y se ocluyó la vena carótida derecha con un corte y dos suturas. Un orificio en el lóbulo adyacente y rostral a la órbita derecha permitió la visualización de MCA, la cual se cauterizó distal a la arteria nasal. Para producir una penumbra (zona de borde) que rodea la lesión MCA fija, se ocluyó la arteria carótida contralateral durante 1 hora utilizando tracción con la ayuda de un fórceps fino y luego se reabrió. Inmediatamente después de MCAO se administró PBS o, rhEPO (5,000 U/kg-bw, intraperitonealmente (i.p.) que anteriormente demostró ser protectora de este modelo (1)). Cuando se indicó, se cuantificó TNF y IL-6 en homogenatos de la corteza cerebral tal como se describe antes (8). Se midió MCP-1 en los homogenatos utilizando un kit ELISA comercial (biosource, Camarillo, CA).

Veinticuatro horas después de MCAO, las ratas se anestesiaron tal como se describió anteriormente y se perfusaron transcárdialmente con 100 ml de solución salina seguido por 250 ml de una solución de paraformaldehído al 4% tamponada en fosfato de sodio. Se retiraron los cerebros rápidamente, se fijaron en la solución de paraformaldehído al 4% tamponada en fosfato de sodio durante dos horas, se transfirieron a una solución sucrosa al 20% en PBS en la noche, luego en solución sucrosa al 30% hasta que se sumergieron y se congelaron en 2-metilbutano a -45 °C. Se cortaron secciones de (30 µm) en un criostato (HM 500 OM, Microm) a -20 °C en un plano transversal a través del cerebro y cada quinto de sección se seleccionaron para histoquímica contra diferentes antígenos, o manchados con hematoxilina-eosina. Las secciones libres flotantes se procesaron en cuanto a inmunorreactividad, ambas con anticuerpo monoclonado de ratón de proteína de ácido fibrilar anti-glial (GFAP) para (1:250, Boehringer Mannheim, Monza, Italia) y con anticuerpo monoclonado de ratón anti-cd11b (MRC OX 42) (1:50, Serotec, UK), de acuerdo con los protocolos descritos por Houser *et al.* y el protocolo del fabricante respectivamente. Todas las secciones

24/3/2
318

divididas) o ausencia de (barras rellenas) de neuronas, con o sin rhEPO (10 U/ml). Se esperarían resultados en tratamientos terapéuticos con citoquina recombinante protectora de tejido de la presente invención.

5 **6.14. EJEMPLO 14: EXAMEN DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR NMDA**

La excitotoxicidad sepuede definir como una activación excesiva de receptores de glutamatos, tal como el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). El receptor NMDA exhibe actividad aumentada en respuesta a isquemia y otros traumas (Fauci et al, 1998, 10 Harrison: *Principles of Internal Medicine*), (Nishizawa, 2001, Life Sci. 69,369-381), (White et al, 2000, J. Neurol. Sci. 179, 1-33). Por ello, esta prueba sirve como modelo para evaluar el efecto de los compuestos en la lesión y muerte celular.

Protocolo de exitotoxicidad NMDA en neuronas primarias del hipocampo

Se prepararon cultivos primarios de neuronas del hipocampo utilizando ratones 15 recién nacidos (de menos de 24 horas) esencialmente, tal como se describió anteriormente por Krohn et al. (1998). En resumen, el hipocampo se disectó en del DMEM que contenía 0,02% de BSA. El tejido se transfirió a DMEM que contenía papaína al 0,1% y se incubó durante 20 minutos a 37 °C. La digestión se detuvo por aspiración de la papaína que contenía el medio y la adición de MEMII y las células hipocampo se 20 disociaron por titulación con la punta de una pipeta de 1000 µl. Se dejaron reposar las piezas del tejido y el sobrenadante que contenía las céluas se transfirió en un MEMII que contenía un inhibidor de tripsina al 1% (tipo II-O) y BSA al 1%. El paso de titulación se repitió tres veces antes que las células se centrifugaran a 600 U/minuto durante 10 minutos y se resuspendieron en un medio de crecimiento (MEMII, 20 mM D-glucosa, 25 100 U/ml penicilina, 1005 µg de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, suero Nu (bovino) al 10%, 2% suplemento B27, NaHCO3 26,2 mM). Se usaron células de 10 hipocampos para sembrar una placa de 24 pozos. Un día después de sembrarlas, la células se trataron con citosina-arabina-furanosida (1µM). En el día 2 el medio se cambió y se agregó citosina-arabina-furanosida (1µM).

30 **Ensayo de Excitotoxicidad**

Se preincubaron cultivos de 12 días con el compuesto de prueba (vehículo, R103E, R150E, o EPO) a 5 nM durante 24 horas. En el día 13, el medio se retiró de las células y se mantuvo mientras que los cultivos se retaron con 300 µM de NMDA durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de la inducción de exitotoxicidad, se regresó el 35 medio preconditionado a los cultivos y se cuantificó la lesión por medio de exclusión de azul de triptano luego de otras 24 horas de incubación. Se contaron aproximadamente 300

318
25-3-94

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica para proteger, mantener, intensificar o restablecer la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano de mamífero que responden a la eritropoyetina, la cual composición farmacéutica comprende una muteína de eritropoyetina recombinante de la SEQ ID NO: 10 con uno o más residuos alterados de aminoácidos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante (i) carece o tiene disminuida la actividad eritropoyética *in vivo* comparada con la eritropoyetina nativa según se determina por el bioanálisis del ratón policitémico exhipóxico; y (ii) tiene actividad protectora tisular según se determina *in vitro* por el examen P19 o *in vivo* por la prueba de la lesión de la arteria cerebral media..
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 con una mutación en una o más de las siguientes posiciones en la molécula de eritropoyetina madura: I6, C7, R10, V11, L12, E13, R14, Y15, K20, E21, N24, C29, A30, H32, C33, N38, P42, D43, T44, K45, V46, N47, F48, Y49, A50, W51, K52, Q59, E62, V63, L67, L70, N83, D96, K97, S100, G101, L102, R103, S104, L105, T106, T107, L108, K116, S126, T132, I133, T134, K140, F142, R143, S146, N147, F148, L149, R150, G151, K152, L153, K154, L155, Y156, G158, A160, C161, y/o R162.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante tiene una o más de las siguientes mutaciones: I6A, C7A, C7S, R10I, V11S, L12A, E13A, R14A, R14E, R14Q, Y15A, Y15F, Y15I, K20A, K20E, E21A, N24K, C29S, C29Y, A30N, H32T, C33S, C33Y, N38K, P42N, P42A, D43A, T44I, K45A, K45D, V46A, N47A, F48A, F48I, Y49A, Y49S, W51F, W51N, K52A, Q59N, E62T, L67S, L70A, N83K, D96R, K97A, S100R, S100E, S100A, S100T, G101A, G101I, L102A, R103A, R103E, S104A, S104I, L105A, T106A, T106I, T107A, T107L, L108K, L108A, L108S, K116A, S126A, T132A, I133A, T134A, K140A, F142I, R143A, S146A, N147K, N147A,

319
2630

F148A, F148Y, L149A, R150A, R150E, G151A, K152A, K152W, L153A, K154A, L155A, G158A, A160S, C161A, y/o R162A.

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 con por lo menos una de las siguientes mutaciones o combinaciones de mutaciones: R14Q [SEQ ID NO: 23], S100E [SEQ ID NO: 62], R103E [SEQ ID NO: 69], R150E [SEQ ID NO: 95], K45D/S100E [SEQ ID NO: 106] o K45D/R150E [SEQ ID NO: 108] o R103E/L108S [SEQ ID NO: 109].
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 con ~~un~~ residuo alterado de aminoácido en una o más posiciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo de posiciones 11, 12, 13, 14, a 15 de la SEQ ID NO: 1, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, a 51 de la SEQ ID NO: 2, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, [[-]]108 de la SEQ ID NO: 3, o 146, 147, 148, 149, 150, y aminoácido [[-]]151 de la SEQ ID NO: 4.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 con i) un residuo alterado de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácido de la molécula de eritropoyetina madura seleccionada de entre el grupo de posiciones 7, 20, 21, 29, 33, 38, 42, 59, 63, 67, 70, 83, 96, 126, 142, 143, 152, 153, 155, 156, o y posición de aminoácido 161;
 - ii) una o más de las sustituciones de los residuos de aminoácidos de las SEQ ID NO.:15-105 y 119;
 - iii) una delección de residuos de aminoácidos 44-49 de la molécula de eritropoyetina madura; o
 - iv) por lo menos una de las sustituciones de aminoácidos de la SEQ ID NOs.:106-118.

- 320
2430
7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante además comprende una modificación química de uno o más aminoácidos.
 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en donde la modificación química se traduce en una alteración de la carga.
 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en donde un residuo cargado de aminoácido se modifica a un residuo no cargado.
 10. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la célula respondedora de mamífero se selecciona de entre el grupo compuesto por una célula neuronal, muscular, cardíaca, pulmonar, hepática, renal, del intestino delgado, de la corteza suprarrenal, de la médula suprarrenal, capilar, endotelial, testicular, ovárica, endometrial o madre.
 11. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en donde la célula respondedora de mamífero se selecciona de entre el grupo compuesto por células fotorreceptoras, ganglionares, bipolares, horizontales, amacrinas, de Mueller, miocárdicas, del marcapaso, del nodo sino-auricular, del nodo sinusal, del nodo aurículo-ventricular, del haz de His, hepatocitos, estrelladas, de Kupffer, mesangiales, caliciformes, de las glándula intestinales, enterales endocrinas, glomerulosas, fasciculadas, reticuladas, cromafines, pericitos, de Leydig, de Sertoli, espermáticas, de los folículos de de Graaf, de los folículos primordiales, del estroma endometrial o endometriales.
 12. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es capaz de atravesar una barrera de células endoteliales.
 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en donde la barrera de células endoteliales se selecciona de entre el grupo compuesto por la barrera hemato-encefálica, la barrera hemato-ocular, la barrera hemato-testicular, la barrera hemato-ovárica y la barrera hemato-uterina.

14. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante tiene por lo menos una de las siguientes modificaciones comparada con la molécula de eritropoyetina nativa:

- i. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13 grupos funcionales de ácido siálico;
- ii. Un número reducido de no carbohidratos enlazados a N;
- iii. un contenido reducido de carbohidratos;
- iv. uno o más carbohidratos oxidados;
- v. uno o más carbohidratos oxidados y la muteína de eritropoyetina recombinante también está químicamente reducida;
- vi. uno o más residuos modificados de arginina;
- vii. uno o más residuos modificados de lisina o una modificación del grupo amino N-terminal;
- viii. uno o más residuos modificados de tirosina;
- ix. uno o más residuos modificados de ácido aspártico o de ácido glutámico;
- x. uno o más residuos modificados de triptófano;
- xi. uno o más grupos de aminoácidos eliminados;
- xii. una abertura de por lo menos uno de los eslabones de cistina;
- xiii. una truncación;
- xiv. una o más moléculas de polietilenglicol conectadas;
- xv. uno o más ácidos grasos conectados;
- xvi. un patrón de glucosilación no perteneciente a los mamíferos
- xvii. uno o más aminoácidos con rótulo de histidina;
- xviii. un número reducido de carbohidratos no vinculados a O.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14 en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es an asialoeritropoyetina.

16. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es hipersializada.

322
29/32

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13 grupos funcionales de ácido siálico.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es una eritropoyetina sin carbohidratos vinculados a N.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es una eritropoyetina con carbohidratos no vinculados a O.
20. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es tratada con por lo menos una glucosidasa.
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es eritropoyetina peryodato-oxidada.
22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde la mencionada eritropoyetina peryodato-oxidada es químicamente reducida con cianoborhidrato de sodio.
23. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende un grupo funcional R-gluoxal sobre uno o más residuos de arginina, en donde R es un grupo funcional arilo o alquilo.
24. La composición farmacéutica de la reivindicación 23, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es fenilgluoxal-eritropoyetina.
25. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es una eritropoyetina en la cual un residuo de arginina es modificado por reacción con una dicetona adyacente seleccionada de entre el grupo compuesto por 2,3-butanediona y ciclohexanediona.

- 322 323
30 30
26. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es una eritropoyetina en la cual un residuo de arginina se hace reaccionar con 3-desoxiglucosona.
27. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde los mencionados lisina modificada o grupo amino N-terminal modificado son por lo menos una lisina biotinilada o un grupo amino N-terminal biotinilado.
28. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada lisina modificada es glucitolil lisina o fructosil lisina.
29. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende por lo menos un residuo de lisina carbamilada.
30. La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante se selecciona de entre el grupo compuesto por: alfa-N-carbamoíleritropoyetina; N-épsilon-carbamoíleritropoyetina; alfa-N-carbamoíl, N-épsilon-carbamoíleritropoyetina; alfa-N-carbamoílasialoeritropoyetina; N-épsilon-carbamoílasialoeritropoyetina; alfa-N-carbamoíl, N-épsilon-carbamoílasialoeritropoyetina; alfa-N-carbamoílhiposialoeritropoyetina; N-épsilon-carbamoílhiposialoeritropoyetina; y alfa-N-carbamoíl, N-épsilon-carbamoílhiposialoeritropoyetina.
31. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende por lo menos un residuo acilado de lisina.
32. La composición farmacéutica de la reivindicación 31, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende por lo menos un residuo acetilado de lisina.
33. La composición farmacéutica de la reivindicación 32, en donde la muteína de eritropoyetina recombinante se selecciona de entre el grupo compuesto por alfa-N-acetileritropoyetina; N-épsilon-acetileritropoyetina; alfa-N-acetil, N-épsilon-

324
325

- acetileritropoyetina; alfa-N-acetilasialoeritropoyetina; N-épsilon-acetilasialoeritropoyetina; alfa-N-acetil, N-épsilon-acetilasialoeritropoyetina; alfa-N-acetilhiposialoeritropoyetina; N-épsilon-acetilhiposialoeritropoyetina; y alfa-N-acetil, N-épsilon-acetilhiposialoeritropoyetina.
34. La composición farmacéutica de la reivindicación 31, en donde un residuo de lisina de la mencionada muteína citocina recombinante protectora tisular es succinilado.
35. La composición farmacéutica de la reivindicación 34, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante se selecciona de entre el grupo compuesto por alfa-N-succinileritropoyetina; N-épsilon-succinileritropoyetina; alfa-N-succinil, N-épsilon-succinileritropoyetina; alfa-N-succinilasialoeritropoyetina; N-épsilon-succinilasialoeritropoyetina; alfa-N-succinil, N-épsilon-succinilasialoeritropoyetina; alfa-N-succinilhiposialoeritropoyetina; N-épsilon-succinilhiposialoeritropoyetina; y alfa-N-succinil, N-épsilon-succinilhiposialoeritropoyetina.
36. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende por lo menos un residuo de lisina modificado por 2,4,6-trinitrobencenosulfonato de sodio u otra sal del mismo.
37. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde el mencionado residuo modificado de tirosina es nitrado o yodado.
38. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde el mencionado residuo modificado de ácido aspártico o ácido glutámico se hace reaccionar con una carbodiimida seguido de reacción con una amina.
39. La composición farmacéutica de la reivindicación 38, en donde la mencionada amina es glucinamida.
40. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en donde la composición farmacéutica es apropiada para administración oral, intranasal o parenteral.

- 325
326
41. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 formulada como una solución para perfusión.
 42. Una composición farmacéutica de citocina recombinante protectora tisular eritropoyetina que comprenden por lo menos una de las siguientes mutaciones o combinaciones de mutaciones: R103E [SEQ ID NO: 69], R150E [SEQ ID NO: 95], K45D/S100E [SEQ ID NO: 106] o K45D/R150E [SEQ ID NO: 108] o R103E/L108S [SEQ ID NO: 109], en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante (i) carece o tiene disminuida la actividad eritropoyética *in vivo* comparada con la eritropoyetina nativa según se determina por el bioanálisis del ratón policitémico exhipóxico; y (ii) tiene actividad protectora tisular según se determina *in vitro* por el examen P19 o *in vivo* por la prueba de la lesión de la arteria cerebral media.
 43. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la muteína de eritropoyetina recombinante de la reivindicación 42.
 44. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 43.
 45. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 43 y por lo menos una región reguladora vinculada operativamente a la molécula de ácido nucleico.
 46. El vector de las reivindicaciones 44 o 45 que es un Vector pCI-neo.
 47. Una célula modificada por ingeniería genética que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 43.-
 48. Una célula que comprende el vector de expresión de las reivindicaciones 44, 45 o 46.
 49. Un método para proteger, mantener o intensificar la viabilidad de una célula, tejido u órgano aislado del cuerpo de un mamífero que comprende exponer las mencionadas célula, tejido u órgano a una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

- 331
3833
75. El método de la reivindicación 49 o 61, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es alfa-N-carbamoíl, N-épsilon-carbamoíleritropoyetina.
 76. El método de la reivindicación 49, 61 o 72, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante tiene por lo menos una molécula de polietilenglicol conectada.
 77. La composición de la reivindicación 53, en donde por lo menos un residuo de lisina de la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es carbamilado.
 78. La composición de la reivindicación 77, en donde todos los residuos de lisina de la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante son carbamilados.
 79. La composición de la reivindicación 53, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es asialoeritropoyetina o eritropoyetina alquilada.
 80. La composición de la reivindicación 53, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es alfa-N-carbamoíl, N-épsilon-carbamoíleritropoyetina.
 81. La composición de la reivindicación 53 o 77, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante tiene por lo menos una molécula de polietilenglicol conectada.
 82. La composición farmacéutica de la reivindicación 51, en donde la composición farmacéutica es formulada para administrarla después de la aparición de la lesión, enfermedad o padecimiento.
 83. La composición farmacéutica de la reivindicación 51, en donde la composición farmacéutica es formulada para administrarla antes de la aparición de la lesión, enfermedad o padecimiento.
 84. La composición farmacéutica de la reivindicación 82 o 83, en donde la lesión o padecimiento es derivación cardiopulmonar, radioterapia o quimioterapia.

- 332
333
85. La composición farmacéutica de la reivindicación 51, en donde la composición farmacéutica formulada para administración durante la fase aguda y/o la fase crónica de la lesión, enfermedad o padecimiento.
 86. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 51 en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es no etitropoyética.
 87. La muteína de eritropoyetina recombinante de la reivindicación 42, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es no etitropoyética.
 88. La composición de la reivindicación 53, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es no etitropoyética.
 89. El método de la reivindicación 61, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante es no etitropoyética.
 90. La composición farmacéutica de la reivindicación 5 o 51, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 con un residuo alterado de aminoácido en una o más posiciones de aminoácidos seleccionada de entre el grupo de posición 11, 12, 13 ,14, o 15 [SEQ ID NO: 1].
 91. La composición de la reivindicación 57, en donde la mencionada muteína de eritropoyetina recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 con un residuo alterado de aminoácido en una o más posiciones de aminoácidos seleccionada de entre el grupo de posición 11, 12, 13 ,14, o 15 [SEQ ID NO: 1].
 92. Una composición farmacéutica para proteger, mantener, intensificar o restablecer la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano de mamífero que responden a la eritropoyetina, la cual composición farmacéutica comprende una eritropoyetina recombinante que tiene por lo menos una molécula de polietilenglicol conectada.
 93. La composición farmacéutica de la reivindicación 93, en donde la célula respondedora de mamífero se selecciona de entre el grupo compuesto por células neuronales, musculares, cardíacas, pulmonares, hepáticas, renales, del intestino

332
40 323
35

delgado, de la corteza suprarrenal, de la médula suprarrenal, capilares, endoteliales, testiculares, ováricas, endometriales y células madre.

94. La composición farmacéutica de la reivindicación 93, en donde la mencionada eritropoyetina recombinante con por lo menos una molécula de polietilenglicol conectada tiene por lo menos una de las siguientes modificaciones adicionales comparada con la molécula de eritropoyetina nativa:

- i. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13 grupos funcionales de ácido siálico;
- ii. un número reducido o inexistente de carbohidratos vinculados a N;
- iii. un contenido reducido de carbohidratos;
- iv. uno o más carbohidratos oxidados;
- v. uno o más carbohidratos oxidados y la eritropoyetina recombinante también está químicamente reducida;
- vi. uno o más residuos modificados de arginina;
- vii. uno o más residuos modificados de lisina o una modificación del grupo amino N-terminal;
- viii. uno o más residuos modificados de tirosina;
- ix. uno o más residuos modificados de ácido aspártico o de ácido glutámico;
- x. uno o más residuos modificados de triptófano;
- xi. uno o más grupos amino eliminados;
- xii. una abertura de por lo menos uno de los eslabones de cistina;
- xiii. una truncación;
- xiv. uno o más ácidos grasos conectados;
- xv. un patrón de glucosilación no perteneciente a los mamíferos;
- xvi. uno o más aminoácidos con rótulo de histidina; o
- xvii. un número reducido o carbohidratos no vinculados a O.

95. Un método para proteger, mantener o intensificar la viabilidad de una célula, tejido u órgano aislado del cuerpo de un mamífero que comprenden exponer las mencionadas célula, tejido u órgano a una composición farmacéutica de la reivindicación 92 o 94.

334
11/33

96. El método de la reivindicación 95, en donde la eritropoyetina recombinante es no etitropoyética.

97. La composición farmacéutica de la reivindicación 92 o 94, en donde la mencionada composición farmacéutica es capaz de

- i) dar protección contra o prevenir una lesión, enfermedad, o padecimiento que afecten una célula, tejido, u órgano respondedor de un mamífero; o
- ii) la intensificación, mantenimiento, restablecimiento, o rejuvenecimiento de la función o viabilidad de una célula, tejido, u órgano respondedor de un mamífero en un mamífero.

98. La composición farmacéutica de la reivindicación 97, en donde el mamífero tiene o se encuentra en riesgo de adquirir disfunción cognitiva, un trastorno convulsivo, trastorno convulsivo crónico, epilepsia, convulsiones, compresión de las raíces nerviosas, esclerosis múltiple, accidente cerebrovascular, hipotensión, paro cardíaco, lesión del sistema nervioso central, pérdida neuronal, isquemia, hemorragia subaracnoidea, aneurisma, aneurisma sangrante, infarto de miocardio, inflamación, pérdida de la función cognitiva relacionada con la edad, daños por radiación, daños por quimioterapia, daños por radioterapia, irradiación del cerebro completo, parálisis cerebral, parálisis cerebral supranuclear, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, enfermedad de Leigh, enfermedad de Guillain Barre, demencia, demencia por sida, demencia senil, demencia con corpúsculos de Lewy, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, alcoholismo, trastorno neuropsiquiátrico o neuropsicológico, trastorno del estado de ánimo, trastorno afectivo monopolar, depresión, trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, manía, trastorno afectivo bipolar, trastorno de ansiedad, ansiedad, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad por déficit de atención, autismo, una enfermedad causada por priones, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, ataxia de Friedrich, enfermedad de Wilson, trauma, lesión concusiva, trauma o isquemia cerebral o de la médula

4
172335
30

espinal , derivación corazón-pulmón, defectos neurológicos por derivación corazón-pulmón, disfunción cognitiva postoperatoria, lesión embólica, hipoxia, disfunción mitocondrial, cirugía de la aorta abdominal, lesión cardíaca, lesión del miocardio, trauma cardíaco, insuficiencia cardíaca crónica, daño de los tejidos oculares, degeneración macular, neuropatía diabética, retinopatía diabética, glaucoma, isquemia retiniana, trauma retiniano, retinitis pigmentosa, daño del nervio óptico, desprendimiento de retina, retinopatía arterioesclerótica, retinopatía hipertensiva, bloqueo de arteria retiniana, bloqueo de vena retiniana, hipotensión, un padecimiento asociado con hipoglucemia o diabetes, diabetes mellitus, síntomas nefróticos, insuficiencia renal agudo, hematoma subdural, trastorno de pánico, distrofia miotónica, distrofia muscular, neuropatía o hepatitis.

99. La composición farmacéutica de la reivindicación 92, 93 94, 97, o 98, en donde la eritropoyetina recombinante con por lo menos una molécula de polietilenglicol conectada es no eritropoyética.
100. La composición farmacéutica de la reivindicación 92, 93 94, 97, o 98, en donde la eritropoyetina recombinante con por lo menos una molécula de polietilenglicol conectada es además carbamilada, alquilada, o es asialoeritropoyetina.

SEQUENCE LISTING

<110> Kenneth S. Warren Institute, Inc.
H. Lundbeck A/S

<120> RECOMBINANT TISSUE PROTECTIVE CYTOKINES AND ENCODING NUCLEIC
ACIDS THEREOF FOR PROTECTION, RESTORATION, AND ENHANCEMENT OF
RESPONSIVE CELLS, TISSUES AND ORGANS

<130> 10165-022-228

<140>

<141>

<150> 60/392,455

<151> 2002-07-01

<150> 60/393,423

<151> 2002-07-03

<160> 213

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Leu Gln Arg Tyr
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu
1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

336
2/5
337

338 337
~~111~~

<400> 4

Ser Asn Phe Leu Arg Gly
 1 5

<210> 5

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutein

<400> 5

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

<210> 6

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutein

<400> 6

Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30		
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Asp	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50					55					60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65				70						75				80	
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
				85				90						95	

339-338
45

Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120				125				
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130				135						140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155				160	
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
			165												

<210> 7
 <211> 580
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 atgggggtgc acgaatgtcc tgccctggctg tggctttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
 ctgggcctcc cagtccctggg cgcaccacca cgccctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
 agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg 240
 atggagggtcg ggcagcaggc cgtagaagtc tggcagggcc tggccctgct gtcggaagct 300
 gtccctgcggg gccaggccct gttggtcaac tcttcccagc cgtgggagcc cctgcactgc 360
 atgtggataa agccgtcagt ggccttcgca gcctcaccac tctgcttcgg gctctgggag 420
 cccagaagga agccatctcc cctccagatg cggcctcagc tgctccactc cgaacaatca 480
 ctgctgacac tttcgcaaac tcttccgagt ctactccaat ttcctccggg gaaagctgaa 540
 gctgtacaca ggggaggcct gcaggacagg ggacagatga 580

<210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8
 agctctcgag gcgcggagat ggggggtgcac gaatg 35

<210> 9
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9
 atgctctaga cacacctggg catctgtccc ctgtcc 36

340 329
46

<210> 10
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

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

<210> 11
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11
catgtggata aagccgtcga gggccttcgc agcctcacca ctctg

45

<210> 12
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12
cagagtgggtg aggctgcgaa ggcctcgcac ggctttatcc acatg

45

<210> 13
<211> 45

340
167391

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13
gagaatatca ctgtcccaga caccgacgtt aatttctatg cctgg

45

<210> 14
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14
ccaggcatag aaattaacgt cgggtgtctgg gacagtgata ttctc

45

<210> 15
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

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

<210> 16
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutein

<400> 16

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

<210> 17

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutein

<400> 17

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

<210> 18

342
 19 343

<211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 18

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

<210> 19
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 19

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

342 342
50 341

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 20
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

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

<210> 21
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 21
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala

344
ST 305

	115						120					125					
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val		
	130						135					140					
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala		
145					150					155					160		
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg												
				165													

<210> 22
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 22																	
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu		
1				5					10					15			
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His		
			20					25					30				
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe		
		35				40						45					
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp		
50					55						60						
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu		
65				70					75					80			
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp		
			85					90					95				
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu		
		100					105						110				
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala		
		115				120						125					
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val		
130					135						140						
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala		
145				150						155					160		
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg												
				165													

<210> 23
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 23																	
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Glu	Tyr	Leu		
1				5					10					15			
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His		
			20					25					30				
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe		
		35				40						45					
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp		
50					55						60						
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu		
65				70					75					80			

345
346

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 24
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 24
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Gln Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 25
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 25
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Ala Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe

347-346
5/3

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

<210> 26
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

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

<210> 27
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 27

348-342
~~54~~

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

<210> 28
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

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

<210> 29
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 349 50

<210> 31
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 31
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Lys Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 32
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 32
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Ser Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140

351
58 352

Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 33
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 33

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

<210> 34
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 34

Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Asn	Glu	His
			20					25					30		
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50					55					60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65				70						75				80	
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
			85						90				95		
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu

353 25
 352

			100					105					110				
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala		
		115					120					125					
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val		
	130					135					140						
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala		
145					150					155					160		
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg												
				165													

<210> 35
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

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

<210> 36
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu		
1				5				10						15			
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His		
		20					25					30					
Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe		
		35				40					45						
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp		
50					55						60						

352
60 354
353

Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
			85						90					95	
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
					165										

<210> 37
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 37															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30		
Tyr	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50					55					60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
			85						90					95	
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
					165										

<210> 38
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 38															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His

335
~~333~~
 354

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

<210> 39
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

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

<210> 40
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

356 354
 670
 354

<400> 40

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

<210> 41

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutein

<400> 41

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

<210> 42

<211> 166

355-355
63 355

<400> 42

```
<210> 43
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

<400> 43

[illegible]

358 356
64

165

<210> 44
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 44
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Asp Val Asn Phe
35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 45
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

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

29-307
65

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 46
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 46
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Ala Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 47
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 47
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Ala Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp

360 358
6%

				85					90					95		
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	
			100					105					110			
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	
		115					120				125					
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	
	130					135					140					
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	
145					150					155					160	
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg											
				165												

<210> 48
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

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

<210> 49
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	
1				5					10					15		
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	
			20					25					30			
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Ala	
		35					40					45				

351359
 17

```

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
  50          55          60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
  65          70          75          80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
          85          90          95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
          100          105          110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
          115          120          125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
          130          135          140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
  145          150          155          160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
          165

```

<210> 50
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

```

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

```

<210> 51
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

```

<400> 51
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu

```

362362
68

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

<210> 52
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 52																
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	
1				5					10					15		
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	
			20					25					30			
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	
		35					40					45				
Tyr	Ala	Phe	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp	
	50					55					60					
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	
65				70						75					80	
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	
			85					90						95		
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	
		100						105					110			
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	
	115						120				125					
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	
	130					135					140					
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	
145				150						155					160	
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg											
				165												

<210> 53
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

303 361
69

[illegible]

<220>
<223> mutein

[illegible]

262
364362
10

<210> 55
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 55

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

<210> 56
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 56

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

365 363
X

145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 57
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 57
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
Gln Gly Ser Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 58
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 58
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Ala Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110

366 364
A

Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 59
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 59	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
	1				5				10					15		
	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30			
	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45				
	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50					55					60					
	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
	65				70					75					80	
	Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Arg
				85					90					95		
	Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105						110		
	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
			115				120					125				
	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
		130					135					140				
	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
	145				150						155					160
	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
					165											

<210> 60
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 60	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
	1				5				10					15		
	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30			
	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45				
	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50					55					60					
	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu

367 368
X

65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
				85					90					95	
Ala	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 61
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 61															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30		
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50				55						60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
			85						90					95	
Lys	Ala	Val	Arg	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 62
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 62															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30		

38 366
71

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

<210> 63
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

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

<210> 64
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

369 367
~~45~~

<400> 64

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

<210> 65

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutein

<400> 65

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

<210> 66

<211> 166

<212> PRT

320 368
~~116~~

<223> mutein

[illegible]

<211> 166

<213> Artificial Sequence

<223> mutein

[illegible]

371-269
7A

<210> 68
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 68
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Ala Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 69
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 69
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Glu Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val

372 370
178

	130					135					140								
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala				
145					150					155					160				
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg														
				165															

<210> 70
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 70

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

<210> 71
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 71

Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu				
1				5					10					15					
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His				
			20				25						30						
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe				
		35				40						45							
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp				
	50				55						60								
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu				
65				70					75						80				
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp				
		85				90							95						

33 37
19

Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ile	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
		100						105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 72
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400>	72														
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30		
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50					55					60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
			85						90					95	
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Ala	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 73
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400>	73														
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30		
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp

370 372
 70
 374

50						55					60					
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	
65					70					75					80	
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	
				85					90					95		
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	
			100					105					110			
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	
		115					120					125				
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	
	130					135					140					
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	
145					150					155					160	
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg											
				165												

<210> 74
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 74																
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	
1				5					10					15		
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	
			20					25					30			
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	
	35					40						45				
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp	
	50					55					60					
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	
65				70						75					80	
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	
				85					90					95		
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Ile	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	
			100					105					110			
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	
		115					120					125				
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	
	130					135					140					
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	
145					150					155					160	
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg											
				165												

<210> 75
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 75																
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	
1				5					10					15		

375 373
81

```

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

```

<210> 76
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

```

<400> 76
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
  1      5      10      15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
      20      25      30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
      35      40      45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
      50      55      60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
      65      70      75      80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
      85      90      95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Leu Leu Leu Arg Ala Leu
      100     105     110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
      115     120     125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
      130     135     140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
      145     150     155     160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
      165

```

<210> 77
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

8/23/74
376

<223> mutein

<400> 77

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

<210> 78

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutein

<400> 78

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

<210> 79

375
28
374

<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 79

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

<210> 80
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 80

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

378 376
214

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 81
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 81
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ala Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 82
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 82
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly

329 377
25

		115					120					125					
Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu		
	130					135					140						
Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Ala	Ile		
145					150					155					160		
Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu		
			165						170					175			
Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp		
		180						185					190				

Arg

<210> 83
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 83																	
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu		
1				5					10					15			
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His		
			20				25						30				
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe		
	35				40						45						
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp		
	50				55						60						
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu		
65				70					75						80		
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp		
			85					90					95				
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu		
		100					105						110				
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala		
	115				120						125						
Pro	Leu	Arg	Thr	Ala	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val		
	130				135						140						
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala		
145				150				155							160		
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg												
				165													

<210> 84
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 84																	
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu		
1				5					10					15			
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His		
			20				25						30				
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe		
	35						40					45					

380 378
26

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Ala Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 85
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

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

<210> 86
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 86
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu

38-379
2

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

<210> 87
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 87																	
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu		
1				5				10					15				
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His		
		20						25					30				
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe		
		35					40					45					
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp		
	50					55					60						
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu		
65				70						75					80		
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp		
			85					90						95			
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu		
		100						105					110				
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala		
	115					120					125						
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Ala	Val		
	130					135					140						
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala		
145				150						155					160		
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg												
				165													

<210> 88
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

$$\begin{array}{r} 380 \\ 380 \\ \hline 760 \end{array}$$

380

[illegible]

<211> 166

<213> Artificial Sequence

<223> mutein

[illegible]

383 381
 381

<210> 90
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

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

<210> 91
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 91
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Tyr Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala

382
384
90

145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 92
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 92
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
Tyr Ser Asn Ala Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 93
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 93
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110

385-383
 385-383

Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
	115						120				125				
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Ala	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 94
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 94															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5				10					15		
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20				25					30			
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35				40					45				
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
50					55						60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65				70						75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
				85					90				95		
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115				120					125				
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Ala	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145				150						155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 95
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 95															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5				10					15		
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20				25					30			
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35				40					45				
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
50					55						60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu

386 384
 3/7

65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
				85					90					95	
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
		130					135				140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Glu	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 96
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 96															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30		
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50					55					60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
			85						90					95	
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
		130					135				140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Ala	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 97
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 97															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30		

38-385
~~38-385~~

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

<210> 98
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 98															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
		20					25					30			
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50					55					60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
			85						90					95	
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
		100						105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
	115						120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Trp	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
					165										

<210> 99
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

38 386
 4/386

<400> 99

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

<210> 100

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutein

<400> 100

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

<210> 101

<211> 166

<212> PRT

~~389 387~~
~~383~~

<223> mutein

[illegible]

<211> 166

<213> Artificial Sequence

<223> mutein

[illegible]

390 388
 388

<210> 103
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 103
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Ser Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 104
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 104
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val

321 329
X 389

130		135		140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg	Gly Lys Leu Lys Leu	Tyr Thr Gly Glu Ala		
145	150	155	160	
Ala Arg Thr Gly Asp Arg				
	165			

<210> 105
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 105

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

<210> 106
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 106

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu	
1 5 10 15	
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Glu His Cys	
20 25 30	
Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Asp Val Asn Phe Tyr	
35 40 45	
Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln	
50 55 60	
Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu	
65 70 75 80	
Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys	
85 90 95	

392
390
390

Ala	Val	Glu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly
			100					105					110		
Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro
		115					120					125			
Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr
	130					135					140				
Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys
145					150					155					160
Arg	Thr	Gly	Asp	Arg											
				165											

<210> 107
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 107															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Asn	Glu	Thr
			20					25					30		
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50					55					60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
			85						90					95	
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg										
				165											

<210> 108
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 108															
Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30		
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Asp	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp

393 391
X

50		55		60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu				
65		70		75
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp				80
	85		90	
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu				95
	100		105	
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala				110
	115		120	
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val				125
	130		135	
Tyr Ser Asn Phe Leu Glu Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala				140
145		150		155
Cys Arg Thr Gly Asp Arg				160
	165			

<210> 109
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 109
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Glu Ser Leu Thr Thr Ser Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 110
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 110
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15

302
100594

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

<210> 111
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 111
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Ala Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Ala Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 112
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

305
392
~~107~~

<223> mutein

<400> 112

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

<210> 113

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutein

<400> 113

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

<210> 114

396
~~402~~
 394

<211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 114

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

Arg

<210> 115
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

<400> 115

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

347 395
187

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Ala Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 116
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 116
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Ala Val Asn Phe
35 40 45
Tyr Ala Trp Ala Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Ala Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Ala Leu Ala Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 117
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutein

<400> 117
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Lys Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Lys Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Lys Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp

396
398

				85					90					95		
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	
			100					105					110			
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	
		115					120					125				
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	
	130					135					140					
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	
145					150					155					160	
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg											
				165												

<210> 118
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

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

<210> 119
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutein

Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Ala	Ala	Leu	
1				5					10					15		
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	
			20					25					30			
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	
		35					40					45				

397
398
399

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 120
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 120
gtctactcca atttcctcga gggaaagctg aagctg

36

<210> 121
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 121
gcttcagctt tccctcgagg aaattggagt agac

34

<210> 122
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 122
ccgtcagtg ccttgagagc ctcaccactc tg

32

<210> 123
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

400 398
106

<400> 123
cagagtgggtg aggctctcaa ggccactgac gg

32

<210> 124
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 124
ccgtcagtg ccttgagagc ctcaccactc tg

32

<210> 125
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 125
cagagtgggtg aggctctcaa ggccactgac gg

32

<210> 126
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 126
cgcagcctca ccacttcgct tcgggctctg g

31

<210> 127
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 127
ccagagcccg aagcgaagtg gtgaggctgc g

31

<210> 128
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

40/ 299
104

<400> 128
gaatatcact gtcccagacg gtggtgcctg gaagaggatg

40

<210> 129
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 129
catcctcttc caggcaccac cgtctgggac agtgatattc

40

<210> 130
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 130
tacctcttgg aggccgcgga ggccgagaat atc

33

<210> 131
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 131
gatattctcg gcctccgcgg cctccaagag gta

33

<210> 132
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 132
gctgacatt tccgcgcact cttccgagtc tactc

35

<210> 133
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 133

402 400
108

gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc

35

<210> 134
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 134
atttcctccg gggagcgtg aagctgtaca cag

33

<210> 135
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 135
ctgtgtacag cttcagcgt ccccgagga aat

33

<210> 136
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 136
ctccggggaa agctggcgt gtacacaggg ga

32

<210> 137
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 137
tcccctgtgt acagcgccag ctttccccgg ag

32

<210> 138
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 138
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg

35

403 404
109

<210> 139
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 139
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt

35

<210> 140
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 140
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg

35

<210> 141
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 141
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact

35

<210> 142
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 142
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc

33

<210> 143
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 143
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca

33

402
110
404

<210> 144
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 144
ctctgggagc ccaggcggaa gccatctccc ct 32

<210> 145
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 145
aggggagatg gcttccgcct gggctcccag ag 32

<210> 146
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 146
gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc 35

<210> 147
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 147
gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 148
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 148
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtagc 35

yes #103
/

<210> 149
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 149
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

<210> 150
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 150
gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc 35

<210> 151
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 151
gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 152
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 152
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtag 35

<210> 153
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 153
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

<210> 154

406 ~~404~~
H2

<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 154
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg 35

<210> 155
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 155
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt 35

<210> 156
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 156
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 157
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 157
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 158
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 158
atttctccg gggagcgctg aagctgtaca cag 33

<210> 159
<211> 33

40x 405
113

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 159
ctgtgtacag cttcagcgct ccccgaggga aat 33

<210> 160
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 160
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 161
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 161
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 162
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 162
atttctccg gggagcgctg aagctgtaca cag 33

<210> 163
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 163
ctgtgtacag cttcagcgct ccccgaggga aat 33

<210> 164
<211> 35
<212> DNA

4108 4106
X

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 164

actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg

35

<210> 165

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 165

caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt

35

<210> 166

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 166

tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc

33

<210> 167

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 167

ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca

33

<210> 168

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 168

atttcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag

33

<210> 169

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

401 407
~~115~~

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 169
ctgtgtacag cttcagcgct ccccgaggga aat 33

<210> 170
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 170
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg 35

<210> 171
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 171
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt 35

<210> 172
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 172
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg 35

<210> 173
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 173
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

<210> 174
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

410
~~410~~

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 174
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 175
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 175
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 176
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 176
atttcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag 33

<210> 177
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 177
ctgtgtacag cttcagcgct ccccgaggga aat 33

<210> 178
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 178
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg 35

<210> 179
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

411 409
11/1

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 179

caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt

35

<210> 180

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 180

agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg

35

<210> 181

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 181

cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact

35

<210> 182

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 182

gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc

35

<210> 183

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 183

gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc

35

<210> 184

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

472 410
~~118~~

<400> 184
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 185
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 185
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 186
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 186
atttcctccg gggagcgcgtg aagctgtaca cag 33

<210> 187
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 187
ctgtgtacag cttcagcgcgt ccccgaggga aat 33

<210> 188
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 188
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg 35

<210> 189
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

413 411
117

<400> 189
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt

35

<210> 190
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 190
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg

35

<210> 191
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 191
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact

35

<210> 192
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 192
gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc

35

<210> 193
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 193
gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc

35

<210> 194
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 194

4/12
12/14
4/14

ctccggggag cgctggcgct gtacacaggg ga

32

<210> 195
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 195
tcccctgtgt acagcgccag cgctccccgg ag

32

<210> 196
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 196
caaggaggcc gagaaaatca cgacgggctg t

31

<210> 197
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 197
acagcccgtc gtgattttct cggcctcctt g

31

<210> 198
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 198
actgcagctt gaatgagaaa atcactgtcc cagacac

37

<210> 199
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 199
gtgtctggga cagtgatttt ctcattcaag ctgcagt

37

415 413
12

<210> 200
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 200
aggccctggtt ggtcaaattct tcccagccgt g 31

<210> 201
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 201
cacggctggg aagatttgac caacagggcc t 31

<210> 202
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 202
atttcctccg gggatggctg aagctgtaca cag 33

<210> 203
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 203
ctgtgtacag cttcagccat ccccggagga aat 33

<210> 204
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 204
agccgagtcc tggaggcggc cctcttgag gccaa 35

4/14
22
4/18

<210> 205
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 205
ttggcctcca agagggccgc ctccaggact cggct 35

<210> 206
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 206
agccgagtcc tggagagggc cctcttgag gccaa 35

<210> 207
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 207
ttggcctcca agagggccct ctccaggact cggct 35

<210> 208
<211> 6059
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 208
ctagagtcga cccgggcggc cgcttcctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 120
atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacia 180
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat gtgggaggtt 240
ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 360
gcgaatggac ggcacctgta gcggcgcatc aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
cgtgaccgct acacttgcca gcgccttagc gccgcctcct ttcgctttct tcccttcctt 480

413 4/4
123

tctcgccacg	ttcgccggct	ttccccgtca	agctctaaat	cggggggctcc	ctttaggggtt	540
ccgatttagt	gcttttacggc	acctcgaccc	caaaaaactt	gattaggggtg	atgggttcacg	600
tagtggggcca	tcgccctgat	agacggtttt	tcgccctttg	acgttggagt	ccacgttctt	660
taatagtgga	ctcttgttcc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	tctattcttt	720
tgatttataa	gggattttgc	cgatttcggc	ctattggtta	aaaaatgagc	tgatttaaca	780
aaaatttaac	gcgaatttta	acaaaatatt	aacgcttaca	atttcctgat	gcggtatttt	840
ctccttacgc	atctgtgcgg	tatttcacac	cgcatacgcg	gatctgcgca	gcaccatggc	900
ctgaaataac	ctctgaaaga	ggaacttggt	taggtacctt	ctgaggcgga	aagaaccagc	960
tgtggaatgt	gtgtcagtta	gggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	1020
tgcaaagcat	gcattctcaat	tagtcagcaa	ccaggtgtgg	aaagtcccca	ggctccccag	1080
caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccatagtc	ccgcccctaa	1140
ctcggcccat	cccgccccta	actcggccca	gttcggccca	ttctcggccc	catggctgac	1200
taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	ccgcctcggc	ctctgagcta	ttccagaagt	1260
agtgaggagg	cttttttggg	ggcctaggct	tttgcaaaaa	gcttgattct	tctgacacaa	1320
cagtctcgaa	cttaaggcta	gagccaccat	gattgaacaa	gatggattgc	acgcaggttc	1380
tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggtcg	1440
ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcagggggcg	ccggttcttt	ttgtcaagac	1500
cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	1560
cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	1620
gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	1680
gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	1740
cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaagccgg	1800
tcttgctgat	caggatgac	tggacgaaga	gcacagggg	ctcgcgccag	ccgaactgtt	1860
cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccgacgg	cgaggatctc	gtcgtgacct	atggcgatgc	1920
ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	1980
gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	ttgctgaaga	2040
gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttctc	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgattc	2100
gcagcgcac	gccttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgagcgggac	tctggggttc	2160
gaaatgaccg	accaagcgac	gcccacctg	ccatcacgat	ggccgcaata	aaatatcttt	2220
attttcatta	catctgtgtg	ttggtttttt	gtgtgaatcg	atagcgataa	ggatccgcgt	2280

418
~~416~~

atggtgcact ctcaagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc 2340
gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca 2400
agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg 2460
cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 2520
ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 2580
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 2700
cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 2760
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaagat 2880
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgcggg caagagcaac tcggtcgccc 2940
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac 3000
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 3060
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 3120
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 3240
aactggcgaa ctacttactc tagcttccc gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttcgggct ggctggttta ttgctgataa 3360
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gactggggc cagatggtaa 3420
gccctcccgat atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 3480
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 3540
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 3600
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 3660
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 3720
aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 3780
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 3840
tgtttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 3900
atacctcgct ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 3960
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 4020
gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatacctaca 4080
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 4140

419 417
185

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 4200
tctttatagt cctgtcgggt ttgcgcacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 4260
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 4320
cttttgctgg ccttttgctc acatggctcg acagatcttc aatattggcc attagccata 4380
ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat 4440
ctatatcata atatgtacat ttatatggc tcatgtccaa tatgaccgcc atgttgcat 4500
tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggc cattagttca tagcccatat 4560
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggccgcg ctggctgacc gcccaacgac 4620
ccccgccc atgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 4680
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg 4740
tatcatatgc caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggcc cgcctggcat 4800
tatgccaggt acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 4860
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcgtgg atagcggttt 4920
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 4980
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactgcg atcgcccgcc ccgttgacgc 5040
aaatgggcgg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 5100
gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 5160
gtgcttctga cacaacagtc tcgaacttaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
attggtctta ctgacatcca ctttgccctt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcgcgga 5460
gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgctccc 5520
tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcatc tgtgacagcc gagtcctgga 5580
gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg 5640
cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag 5700
gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaagc 5760
tgtcctgcgg ggccaggccc tgttggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 5820
gcatgtggat aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880
agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940

420 7/18
126

cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttcctcc ggggaaagct 6000
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggaccat catcaccatc accattgat 6059

<210> 209
<211> 6059
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 209

ctagagtcga cccgggcggc cgcttcctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 120
atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacia 180
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcagggtc agggggagat gtgggaggtt 240
ttttaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 360
gcgaatggac gcgccctgta gcggcgcatc aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt 480
tctcgccacg ttcgcccggc tccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt 540
ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggtg atggttcacg 600
tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt 660
taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 720
tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattgggta aaaaatgagc tgatttaaca 780
aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttcctgat gcggtatttt 840
ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatacgcg gatctgcgca gcaccatggc 900
ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggt taggtacctt ctgaggcgga aagaaccagc 960
tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtgaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta 1020
tgcaaagcat gcattctaat tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccca ggctccccag 1080
caggcagaag tatgcaaagc atgcattctc attagtcagc aaccatagtc ccgccctaa 1140
ctccgcccat cccgcccta actccgccca gttccgccca ttctccgcc catggctgac 1200
taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 1260
agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa gcttgattct tctgacacaa 1320
cagtctcgaa ctttaaggcta gagccacatc gattgaacaa gatggattgc acgcagggtc 1380
tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg 1440

421 #19

ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcagggggcg	ccggttcttt	ttgtcaagac	1500
cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	1560
cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	1620
gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	1680
gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	1740
cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaagccgg	1800
tcttgctgat	caggatgatc	tggaagaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactgtt	1860
cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccagcgg	cgaggatctc	gtcgtgacct	atggcgatgc	1920
ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaataatg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	1980
gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	ttgctgaaga	2040
gcttgggcgg	gaatgggctg	accgcttctt	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgatcc	2100
gcagcgcata	gccttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgagcgggac	tctggggttc	2160
gaaatgaccg	accaagcgac	gccaacctg	ccatcacgat	ggccgcaata	aaatatcttt	2220
attttcatta	catctgtgtg	ttgggttttt	gtgtgaatcg	atagcgataa	ggatccgcgt	2280
atggtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgacaccc	2340
gccaacaccc	gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	ccggcatccg	cttacagaca	2400
agctgtgacc	gtctccggga	gctgcatgtg	tcagagggtt	tcaccgtcat	caccgaaacg	2460
cgcgagacga	aagggcctcg	tgatacgctt	atttttatag	gttaatgtca	tgataataat	2520
ggtttcttag	acgtcagggt	gcacttttct	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatttgttt	2580
atttttctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	2640
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	2700
cttttttgcg	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	2760
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	2820
taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	2880
tctgctatgt	ggcgcgggtat	tatcccgat	tgacgcgggg	caagagcaac	tcggtcgccg	2940
catacactat	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	3000
ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataacactgc	3060
ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	3120
catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	3180
aaacgacgag	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	3240

42420
178

aactggcgaa	ctacttactc	tagcttcccc	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	3300
taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	3360
atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcg	tatcattgca	gactggggc	cagatggtaa	3420
gccctccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	3480
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggtaactgt	cagaccaagt	3540
ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	3600
gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	3660
agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gacccctttt	ttctgcgcgt	3720
aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	tgccggatca	3780
agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaatac	3840
tgttcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	3900
atacctcgct	ctgctaatac	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	3960
taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	4020
gggttcgtgc	acacagccca	gcttgagcg	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	4080
gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	4140
aagcggcagg	gtcggaacag	gagagcgcac	gaggagactt	ccagggggaa	acgcctggta	4200
tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	4260
gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	4320
cttttgctgg	ccttttgctc	acatggctcg	acagatcttc	aatattggcc	attagccata	4380
ttattcattg	gttatatagc	ataaatcaat	attggctatt	ggccattgca	tacgttgat	4440
ctatatcata	atatgtacat	ttatattggc	tcatgtccaa	tatgaccgcc	atgttgcat	4500
tgattattga	ctagttatta	atagtaatca	attacggggg	cattagttca	tagcccatat	4560
atggagttcc	gcgttacata	acttacggta	aatggcccgc	ctggctgacc	gccaacgac	4620
ccccgccc	tgacgtcaat	aatgacgtat	gttcccatag	taacgccaat	agggactttc	4680
cattgacgtc	aatgggtgga	gtatttacgg	taaactgccc	acttggcagt	acatcaagt	4740
tatcatatgc	caagtccgcc	ccctattgac	gtcaatgacg	gtaaatggcc	cgccctggcat	4800
tatggccagt	acatgacctt	acgggacttt	cctacttggc	agtacatcta	cgtattagtc	4860
atcgctatta	ccatggtgat	gcggttttgg	cagtacacca	atgggcgtgg	atagcggttt	4920
gactcacggg	gattttcaa	tctccacccc	attgacgtca	atgggagttt	gttttggcac	4980
caaaatcaac	gggactttcc	aaaatgtcgt	aacaactgcg	atcgcccgcc	ccgttgacgc	5040
aaatgggcgg	taggcgtgta	cggtgggagg	tctatataag	cagagctcgt	ttagtgaacc	5100

423 424
129

gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 5160
gtgcttctga cacaacagtc tcgaacttaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
attggtctta ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcgcgga 5460
gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgctccc 5520
tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcctc tgtgacagcc gagtcctgga 5580
gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgta atgaaacctg 5640
cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag 5700
gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaagc 5760
tgtcctgcgg ggccaggccc tgttggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 5820
gcatgtggat aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880
agcccagaag gaagccatct ccctccaga tggggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940
cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttccctcc ggggaaagct 6000
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggaccat catcaccatc accattgat 6059

<210> 210
<211> 6059
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 210
ctagagtcga cccgggcggc cgcttcctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 120
atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca 180
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat gtgggaggtt 240
ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 360
gcgaatggac gcgccctgta gcggcgcatc aagcgcgggc ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttccct 480
tctcgccacg ttcgccggtt ttcccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt 540

422
~~138~~
424

ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggtg atgggttcacg 600
tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttgaggat ccacgtttctt 660
taatagtgga ctcttggtcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 720
tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattgggta aaaaatgagc tgatttaaca 780
aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttcctgat gcgggtatttt 840
ctccttacgc atctgtgagg tatttcacac cgcatacggc gatctgcgca gcaccatggc 900
ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggt taggtacctt ctgaggcgga aagaaccagc 960
tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtgga agtccccagg ctccccagca ggcagaagta 1020
tgcaaagcat gcctctcaat tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccca ggctccccag 1080
caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgccctaa 1140
ctccgcccat ccgcccccta actccgccca gtccgccca ttctccgcc catggctgac 1200
taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 1260
agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct ttgcaaaaa gcttgattct tctgacacaa 1320
cagtctcgaa ctttaaggcta gagccaccat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc 1380
tcgggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg 1440
ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggggc ccggttcttt ttgtcaagac 1500
cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtgggtggc 1560
cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg 1620
gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga 1680
gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg 1740
cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg 1800
tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgccag ccgaactgtt 1860
cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc 1920
ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg 1980
gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggtt acccgtgata ttgctgaaga 2040
gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc 2100
gcagcgcate gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc 2160
gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgat ggccgcaata aaatatcttt 2220
attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgaatcg atagcgataa ggatccgcgt 2280
atgggtgact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc 2340
gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca 2400

423
13X
425

agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg 2460
cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 2520
ggtttcttag acgtcagggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 2580
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 2700
cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 2760
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaaagt 2880
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgcgggg caagagcaac tcggtcgccc 2940
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 3000
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 3060
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 3120
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 3240
aactggcgaa ctacttactc tagcttccc gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ctttcgggt ggctggttta ttgctgataa 3360
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 3420
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 3480
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 3540
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 3600
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 3660
agcgtcagac ccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 3720
aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca 3780
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggttcagc agagcgcaga taccaaatac 3840
tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 3900
atacctcgct ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 3960
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 4020
gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac accgaactga gataacctaca 4080
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 4140
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 4200

426 424
528

tctttatagt	cctgtcgggt	ttgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	4260
gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	4320
cttttgctgg	ccttttgctc	acatggctcg	acagatcttc	aatattggcc	attagccata	4380
ttattcattg	gttatatagc	ataaatcaat	attggctatt	ggccattgca	tacgttgat	4440
ctatatcata	atatgtacat	ttatattggc	tcatgtccaa	tatgaccgcc	atgttgcat	4500
tgattattga	ctagttatta	atagtaatca	attacggggg	cattagttca	tagcccatat	4560
atggagttcc	gcgttacata	acttacggta	aatggccgcg	ctggctgacc	gcccaacgac	4620
ccccgcccat	tgacgtcaat	aatgacgtat	gttcccatag	taacgccaat	agggactttc	4680
cattgacgtc	aatgggtgga	gtatttacgg	taaactgccc	acttggcagt	acatcaagtg	4740
tatcatatgc	caagtccgcc	ccctattgac	gtcaatgacg	gtaaatggcc	cgcttgcat	4800
tatgcccgat	acatgacctt	acgggacttt	cctacttggc	agtacatcta	cgtattagtc	4860
atcgctatta	ccatggtgat	gcggttttgg	cagtacacca	atgggcgtgg	atagcggttt	4920
gactcacggg	gattttcaag	tctccacccc	attgacgtca	atgggagttt	gttttgacac	4980
caaaatcaac	gggactttcc	aaaatgtcgt	aacaactgcg	atcgcccgcc	ccgttgacgc	5040
aaatgggcgg	taggcgtgta	cggtgggagg	tctatataag	cagagctcgt	ttagtgaacc	5100
gtcagatcac	tagaagcttt	attgcggtag	tttatcacag	ttaaattgct	aacgcagtca	5160
gtgcttctga	cacaacagtc	tgaacttaa	gctgcagtga	ctctcttaag	gtagccttgc	5220
agaagttggt	cgtgaggcac	tgggcaggta	agtatcaagg	ttacaagaca	ggtttaagga	5280
gaccaataga	aactgggctt	gtcgagacag	agaagactct	tgcgtttctg	ataggcacct	5340
attggtctta	ctgacatcca	ctttgccttt	ctctccacag	gtgtccactc	ccagttcaat	5400
tacagctctt	aaggctagag	tacttaatac	gactcactat	aggctagcct	cgagcgcgga	5460
gatgggggtg	cacgaatgtc	ctgcctggct	gtggcttctc	ctgtccctgc	tgtcgctccc	5520
tctgggcctc	ccagtctctg	gcgccccacc	acgcctcatc	tgtgacagcc	gagtcctgga	5580
gaggtacctc	ttggaggcca	aggaggccga	gaatatcacg	acgggctgtg	ctgaacactg	5640
cagcttgaat	gagaatatca	ctgtcccaga	caccgacgtt	aatttctatg	cctggaagag	5700
gatggaggtc	gggcagcagg	ccgtagaagt	ctggcagggc	ctggccctgc	tgtcggaagc	5760
tgtcctgcgg	ggccaggccc	tgttggtcaa	ctcttcccag	ccgtgggagc	ccctgcagct	5820
gcatgtggat	aaagccgtca	gtggccttcg	cagcctcacc	actctgcttc	gggctctgcg	5880
agcccagaag	gaagccatct	ccctccaga	tgcggcctca	gctgctccac	tccgaacaat	5940
cactgctgac	actttccgca	aactcttccg	agtctactcc	aatttctctc	ggggaaagct	6000
gaagctgtac	acaggggagg	cctgcaggac	aggggaccat	catcaccatc	accattgat	6059

42x 425
175

<210> 211
<211> 6059
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 211

ctagagtcga cccgggcggc cgcttcctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg	60
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt	120
atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacia	180
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat gtgggaggtt	240
ttttaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct	300
ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg	360
gcgaatggac gcgccctgta gcggcgcatc aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag	420
cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt	480
tctcgccacg ttcgcccgtt tccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt	540
ccgatttagt gctttacggc acctcgacct caaaaaactt gattaggggtg atgggtcacg	600
tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttgaggt ccacgttctt	660
taatagtgga ctcttggtcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt	720
tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca	780
aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttcctgat gcggtatttt	840
ctccttaagc atctgtgcgg tatttcacac cgcatacgcg gatctgcgca gcaccatggc	900
ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggc taggtacctt ctgaggcgga aagaaccagc	960
tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtgga agtccccagg ctccccagca ggcagaagta	1020
tgcaaagcat gcattctaat tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccca ggctccccag	1080
caggcagaag tatgcaaagc atgcattctc attagtcagc aaccatagtc ccgccctaa	1140
ctccgcccat ccgcccccta actccgccca gttccgccca ttctccgcc catggctgac	1200
taattttttt tatttatgca gagggcgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt	1260
agtgaggagg ctttttttga ggcctaggct tttgcaaaaa gcttgattct tctgacacia	1320
cagtctcgaa ctttaaggcta gagccaccat gattgaacaa gatggattgc acgcagggtc	1380
tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg	1440
ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac	1500

420 426
12/17

cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc 1560
cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg 1620
gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga 1680
gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg 1740
cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaaagccgg 1800
tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt 1860
cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc 1920
ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg 1980
gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggt acccgtgata ttgctgaaga 2040
gcttgccggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc 2100
gcagcgcata gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctgggggtc 2160
gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgat ggccgcaata aaatatcttt 2220
attttcatta catctgtgtg ttgggttttt gtgtgaatcg atagcgataa ggatccgcgt 2280
atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc 2340
gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca 2400
agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg 2460
cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 2520
ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttct gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 2580
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 2700
cttttttgcg gcattttgcc ttctgttttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 2760
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
taagatcctt gagagttttc gcccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaagt 2880
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgcggg caagagcaac tcggtcgccg 2940
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac 3000
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 3060
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa 3120
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 3240
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 3360

419 427
135

atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	3420
gccctcccg	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	3480
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggtaactgt	cagaccaagt	3540
ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	3600
gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	3660
agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	3720
aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	tgccggatca	3780
agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaatac	3840
tgttcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	3900
atacctcgct	ctgctaatec	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	3960
taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	4020
gggttcgtgc	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	gataacctaca	4080
gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgccttc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccgg	4140
aagcggcagg	gtcgggaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	4200
tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	4260
gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	4320
cttttgctgg	ccttttgctc	acatggctcg	acagatcttc	aatattggcc	attagccata	4380
ttattcattg	gttatatagc	ataaatcaat	attggctatt	ggccattgca	tacgttgtat	4440
ctatatcata	atatgtacat	ttatatggc	tcatgtccaa	tatgaccgcc	atgttggcat	4500
tgattattga	ctagttatta	atagtaatca	attacgggg	cattagttca	tagcccatat	4560
atggagttcc	gcgttacata	acttacggta	aatggcccg	ctggctgacc	gccaacgac	4620
ccccgcccat	tgacgtcaat	aatgacgtat	gttcccatag	taacgccaat	agggactttc	4680
cattgacgtc	aatgggtgga	gtattttacg	taaactgcc	acttggcagt	acatcaagtg	4740
tatcatatgc	caagtcgcc	ccctattgac	gtcaatgacg	gtaaatggcc	cgcctggcat	4800
tatgcccgat	acatgacctt	acgggacttt	cctacttggc	agtacatcta	cgtattagtc	4860
atcgctatta	ccatggtgat	gcggttttgg	cagtacacca	atgggcgtgg	atagcggttt	4920
gactcacggg	gattttccaag	tctccacccc	attgacgtca	atgggagttt	gttttggcac	4980
caaaatcaac	gggactttcc	aaaatgtcgt	aacaactgcg	atcgcccgcc	ccgttgacgc	5040
aaatgggcgg	taggcgtgta	cggtgggagg	tctatataag	cagagctcgt	ttagtgaacc	5100
gtcagatcac	tagaagcttt	attgcggtag	tttatcacag	ttaaattgct	aacgcagtc	5160

430 428
125

gtgcttctga cacaacagtc tcgaacttaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
agaagttggc cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
attggtctta ctgacatcca ctttgccctt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcgcgga 5460
gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgtctcc 5520
tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcatc tgtgacagcc gagtcctgga 5580
gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg 5640
cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag 5700
gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaagc 5760
tgtcctgcgg ggccaggccc tgttgggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 5820
gcatgtggat aaagccgtcg agggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880
agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940
cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttccctc ggggaaagct 6000
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggaccat catcaccatc accattgat 6059

<210> 212
<211> 6059
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 212
ctagagtcga cccgggaggc cgcttccctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 120
atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacia 180
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcagggtc agggggagat gtgggagggt 240
ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 360
gcgaatggac gcgcctgtga gcggcgcatc aagcgcgggc ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
cgtgaccgct acaattgcca gcgccttagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttccct 480
tctcgccacg ttcgcccggc ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt 540
ccgatttagt gctttacggc acctcgacce caaaaaactt gattaggggtg atgggttcacg 600
tagtgggcca tcgcctgat agacggtttt tcgcctttg acgttggagt ccacgttctt 660

431 429
X

taatagtgga	ctcttgttcc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	tctattcttt	720
tgatttataa	gggattttgc	cgatttcggc	ctattgggta	aaaaatgagc	tgatttaaca	780
aaaatttaac	gcgaatttta	acaaaatatt	aacgcttaca	atttcctgat	gcggtatttt	840
ctccttacgc	atctgtgcgg	tatttcacac	cgcatacgcg	gatctgcgca	gcaccatggc	900
ctgaaataac	ctctgaaaga	ggaacttggt	taggtacctt	ctgaggcgga	aagaaccagc	960
tgtggaatgt	gtgtcagtta	gggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	1020
tgcaaagcat	gcattctcaat	tagtcagcaa	ccaggtgtgg	aaagtcccca	ggctccccag	1080
caggcagaag	tatgcaaagc	atgcattctca	attagtcagc	aaccatagtc	ccgcccctaa	1140
ctcgcgccat	cccgccccta	actcgcacca	gttcgcacca	ttctcgcgcc	catggctgac	1200
taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	ccgcctcggc	ctctgagcta	ttccagaagt	1260
agtgaggagg	cttttttggg	ggcctaggct	tttgcaaaaa	gcttgattct	tctgacacaa	1320
cagtctcgaa	cttaaggcta	gagccaccat	gattgaacaa	gatggattgc	acgcaggttc	1380
tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggtg	1440
ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcagggggcg	ccggttcttt	ttgtcaagac	1500
cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	1560
cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	1620
gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	1680
gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	1740
ccatttcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaagccgg	1800
tcttgtcgat	caggatgatc	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactgtt	1860
cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccgacgg	cgaggatctc	gtcgtgacct	atggcgatgc	1920
ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	1980
gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggct	accctgata	ttgtgaaga	2040
gcttgggggc	gaatgggctg	accgttctct	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgattc	2100
gcagcgcate	gccttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgagcgggac	tctgggggtc	2160
gaaatgaacc	accaagcgac	gcccacactg	ccatcacgat	ggccgcaata	aaatatcttt	2220
attttcatta	catctgtgtg	ttggtttttt	gtgtgaatcg	atagcgataa	ggatccgcgt	2280
atggtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgacaccc	2340
gccaacaccc	gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	ccggcatccg	cttacagaca	2400
agctgtgacc	gtctccggga	gctgcatgtg	tcagagggtt	tcaccgtcat	caccgaaacg	2460

432 430
X 28

cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 2520
ggttttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 2580
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 2700
cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 2760
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaagtt 2880
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 2940
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 3000
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 3060
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 3120
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 3240
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttcgggt ggctggttta ttgctgataa 3360
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 3420
gccctcccg atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 3480
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 3540
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taattttaaa ggatctaggt 3600
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 3660
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 3720
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 3780
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 3840
tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 3900
atacctcgct ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 3960
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 4020
gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 4080
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 4140
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 4200
tctttatagt cctgtcgggt ttgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 4260
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 4320

433 431
129

cttttgctgg ccttttgctc acatggctcg acagatcttc aatattggcc attagccata	4380
ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat	4440
ctatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgaccgcc atgttggcat	4500
tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggc cattagttca tagcccatat	4560
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgcc ctggctgacc gcccaacgac	4620
ccccgcccac tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc	4680
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg	4740
tatcatatgc caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcttggcat	4800
tatgcccagt acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc	4860
atcgctatta ccattggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggctggg atagcggttt	4920
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac	4980
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactgcg atcgcccgcc ccgttgacgc	5040
aaatgggcgg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc	5100
gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca	5160
gtgcttctga cacaacagtc tcgaacttaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc	5220
agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga	5280
gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct	5340
attggtctta ctgacatcca ctttgctttt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat	5400
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcgcgga	5460
gatgggggtg cacgaatgtc ctgcttggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgctccc	5520
tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgctcctc tgtgacagcc gagtcctgga	5580
gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg	5640
cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccgacgtt aatttctatg cctggaagag	5700
gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaagc	5760
tgtcctgcgg ggccaggccc tgttggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct	5820
gcatgtggat aaagccgtcg agggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg	5880
agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat	5940
cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttccctc ggggaaagct	6000
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggaccat catcaccatc accattgat	6059

432
~~433~~
 434

<211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 213

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

Arg
 =

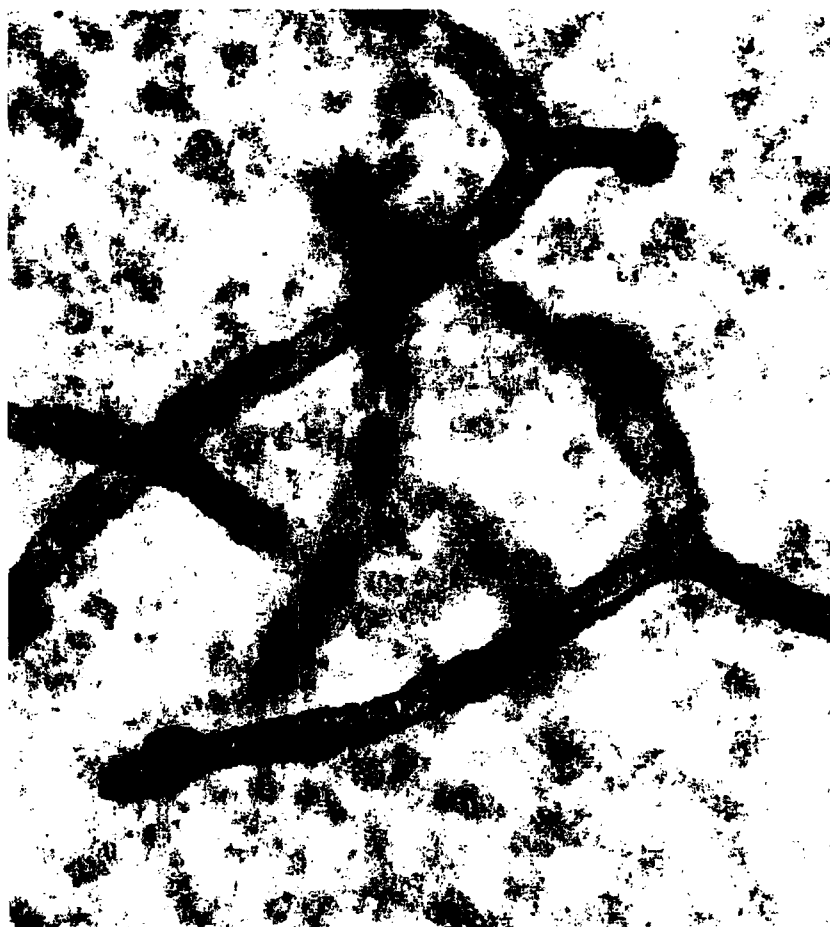
FIG. 1



1/37

433
435

FIG. 2



2/37

435
2/37
435

U37 435
145

3/37

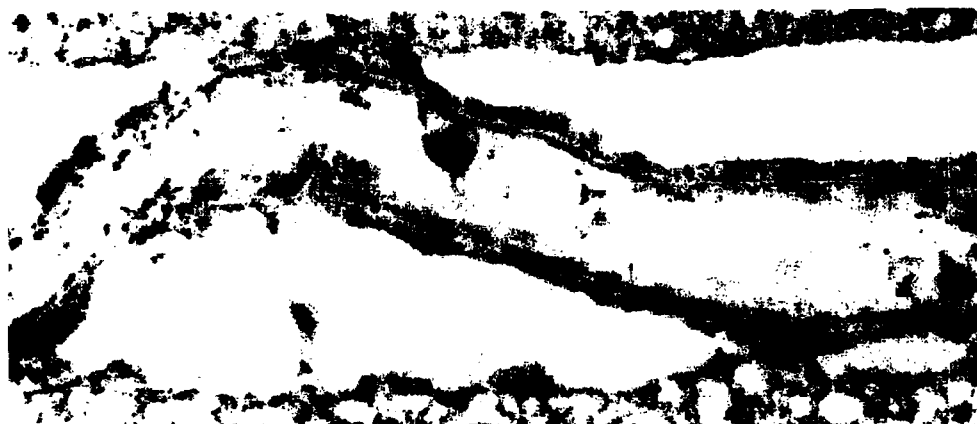


FIG.3



FIG.4

4/37

use 4/37
4/37

491 #39
11/1

7/37

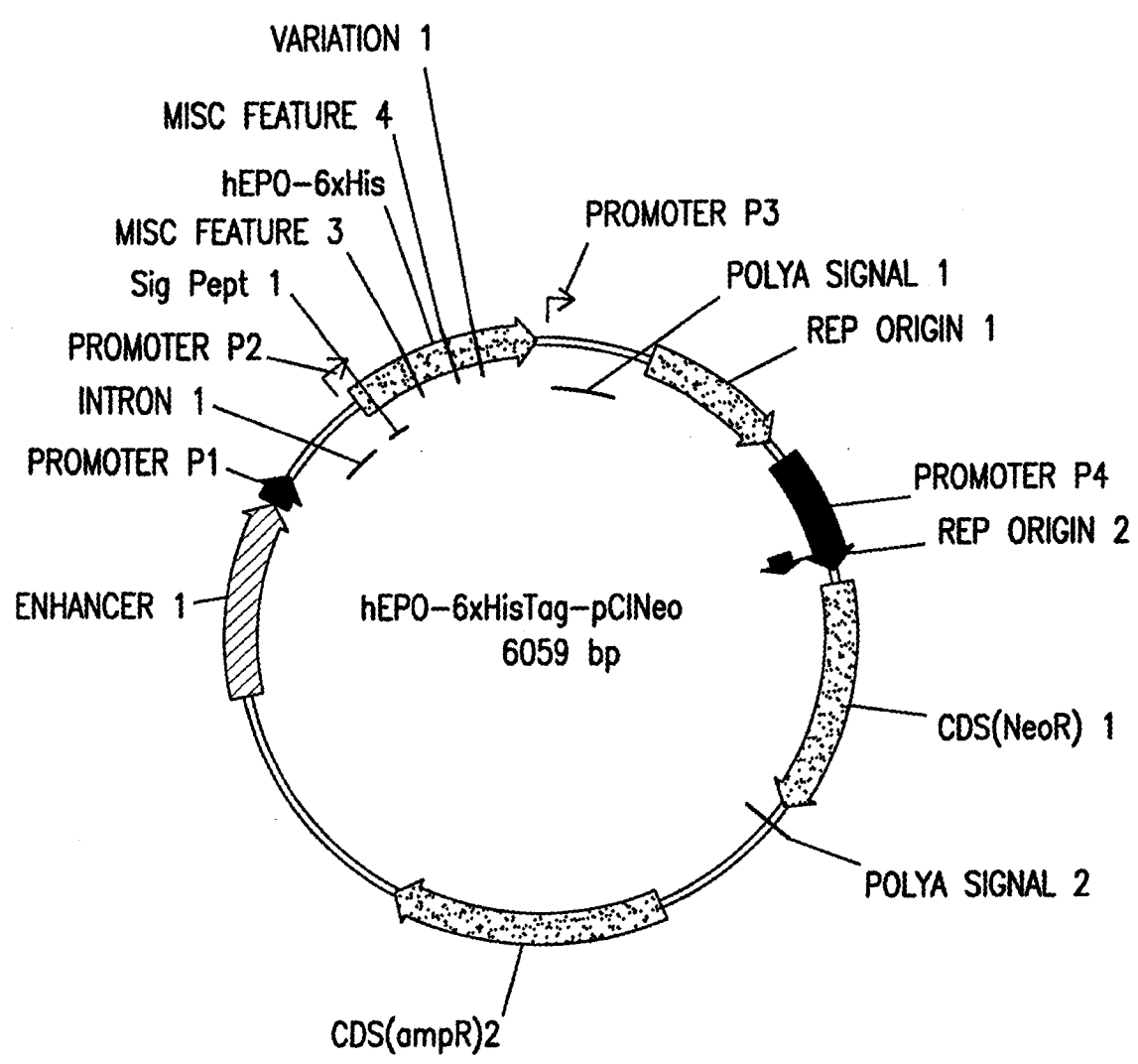


FIG.6B

8/37

442410
H

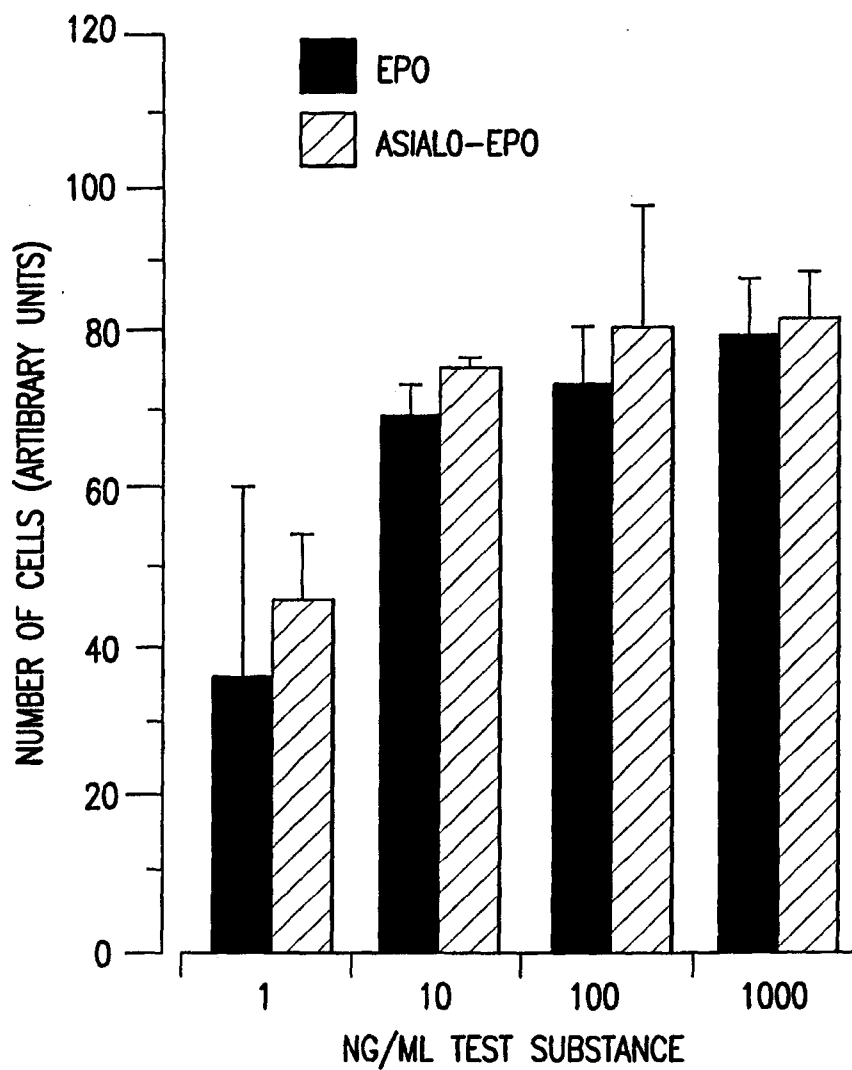


FIG.7

442
150
444

10/37

ASIALOERYTHROPOIETIN REDUCES INFARCT VOLUME
AS WELL AS ERYTHROPOIETIN

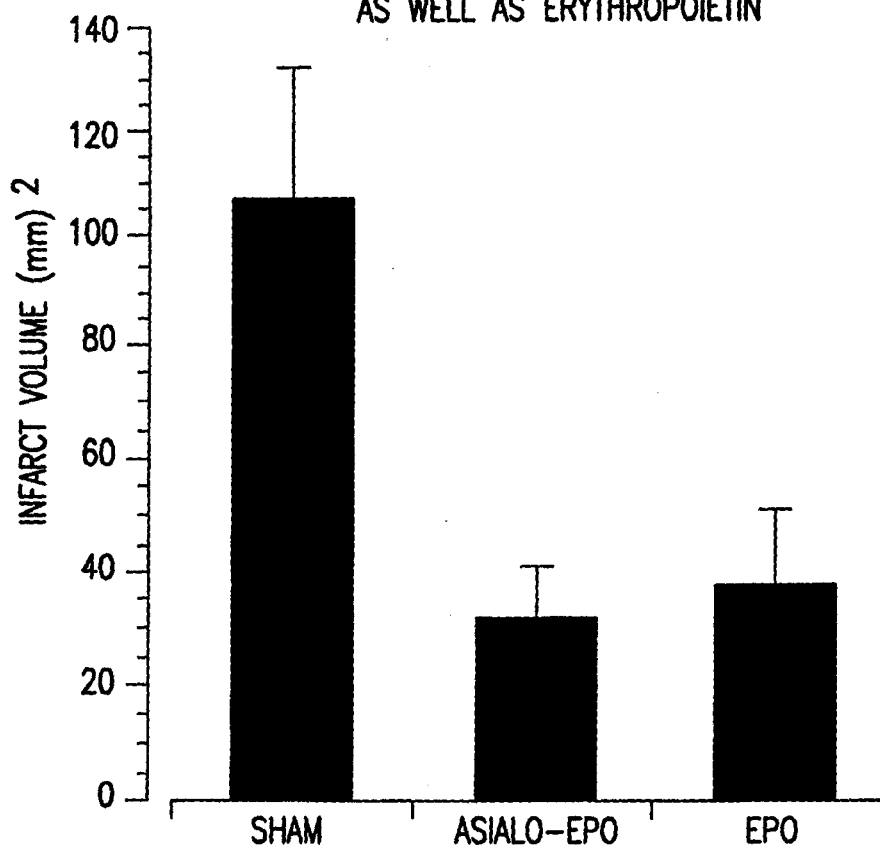
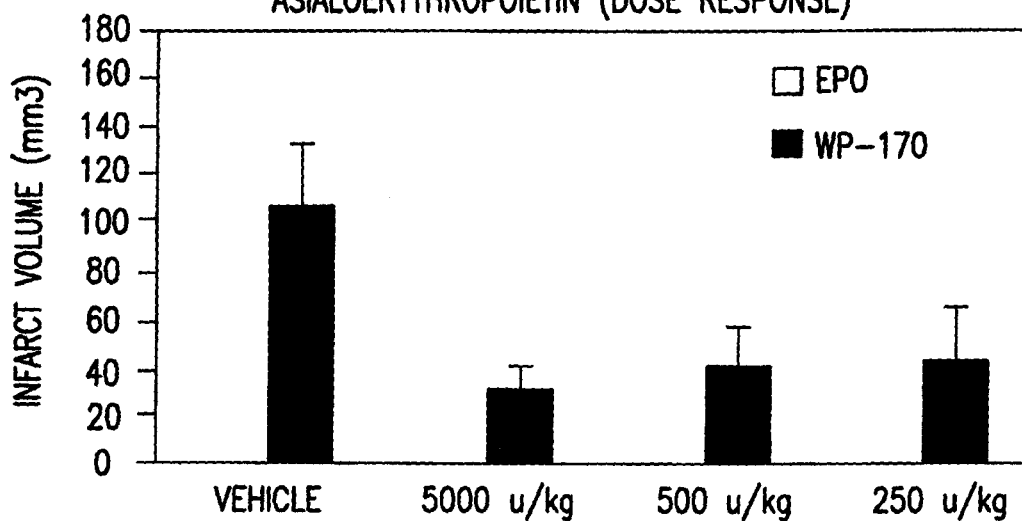


FIG.9

ASIALOERYTHROPOIETIN (DOSE RESPONSE)

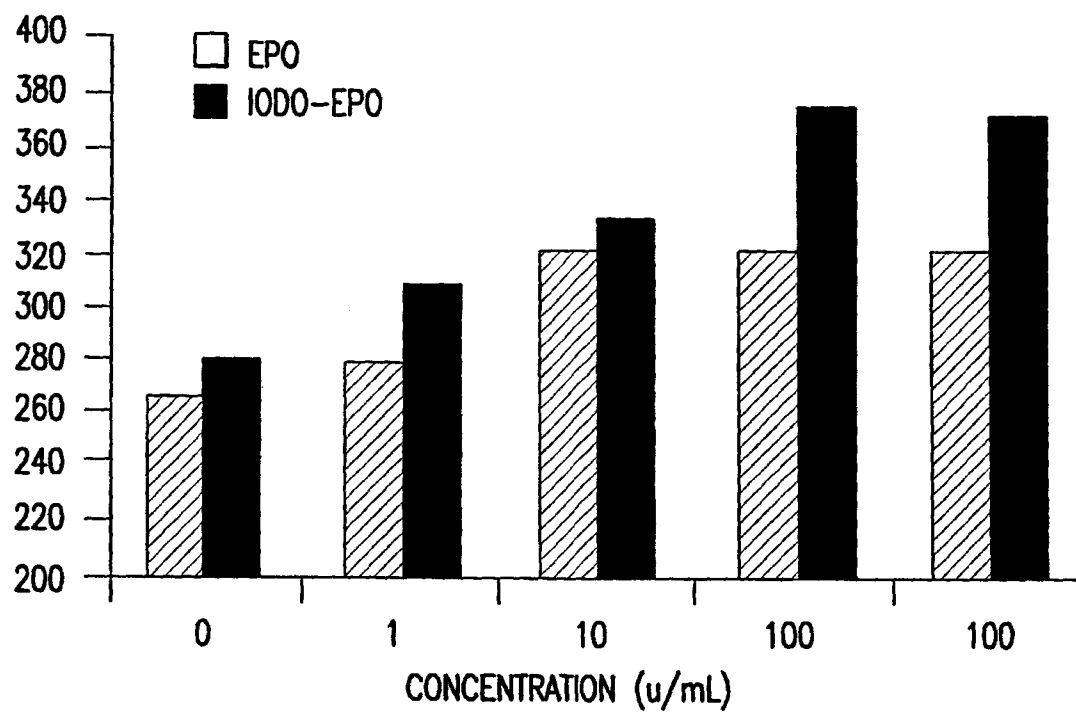


n FOR EACH GROUP IS
GREATER THAN OR EQUAL TO 4

FIG.10

443

PROTECTION OF P19 CELLS FROM SERUM DEPRIVATION BY IODO-EPO



11/37

FIG. 11

443
Sht
3/5

445-444
152

12/37

BIOTINYLATED-EPO AND ASIALO-EPO RETAIN
ACTIVITY IN P19 ASSAY

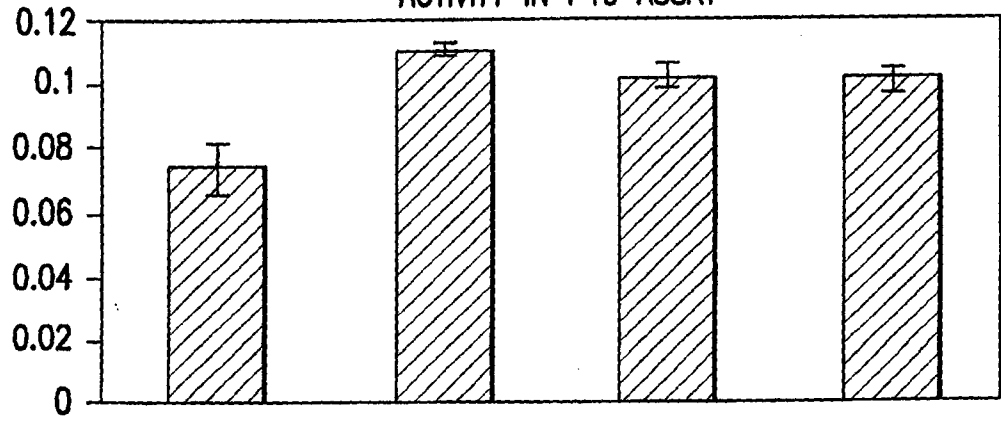


FIG.12

SURVIVAL OF P19 CELLS AFTER SERUM WITHDRAWAL

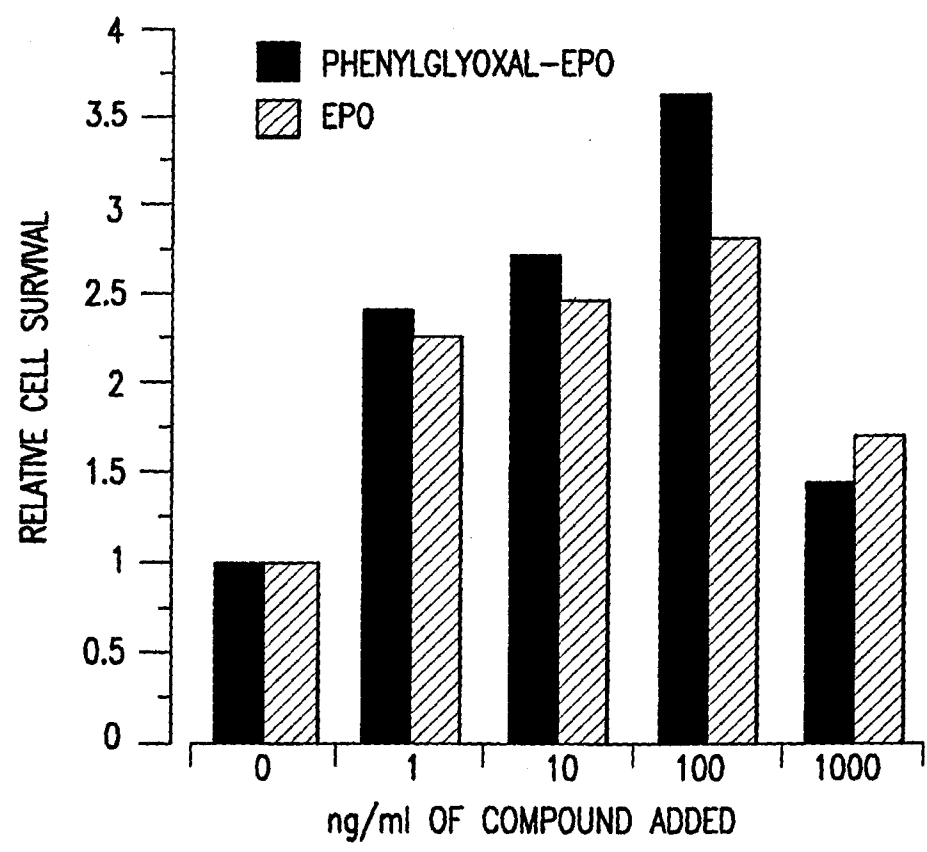


FIG.13

14/37

948 446
15/16

ERYTHROPOIETIN IMPROVES CARDIAC FUNCTION IN
A HEART ISOLATED FOR TRANSPLANTATION

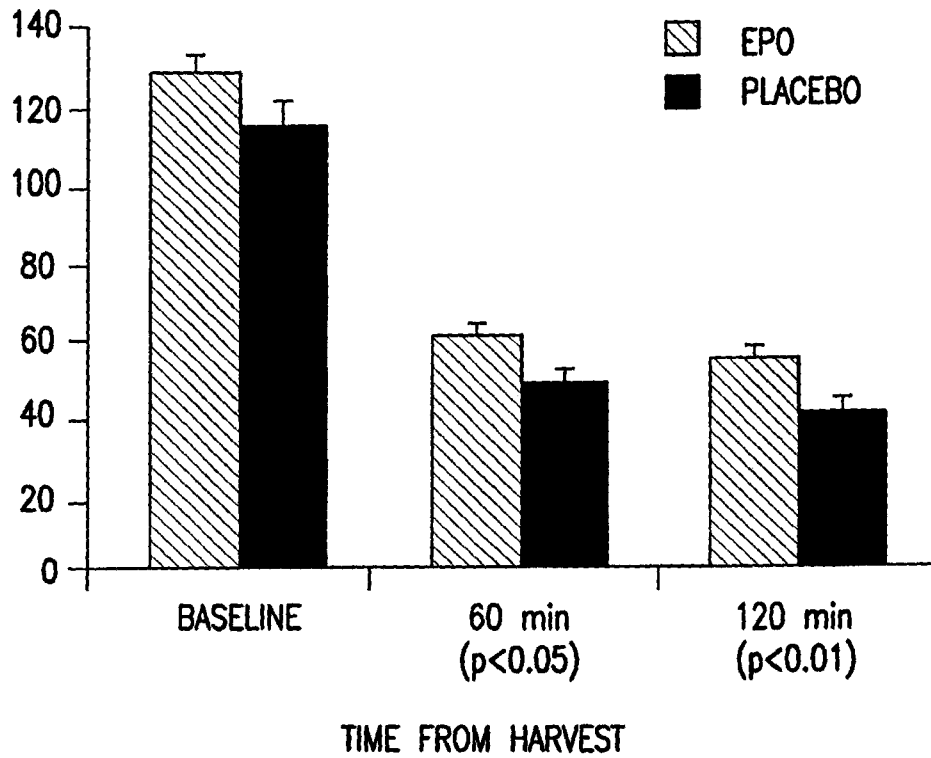


FIG.15

448

ELECTRORETINOGRAMS
FROM RATS SUBJECTED
TO 60 MINUTES OF
ISCHEMIA

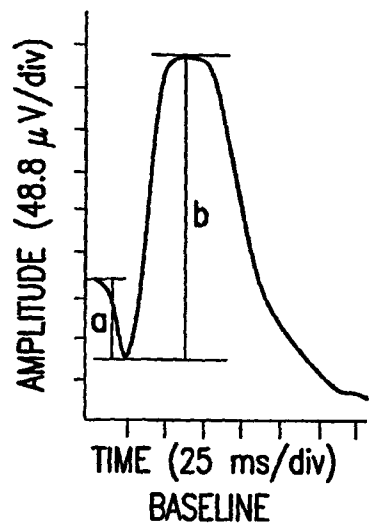


FIG.17A

ELECTRORETINOGRAMS
FROM RATS SUBJECTED
TO 60 MINUTES OF
ISCHEMIA

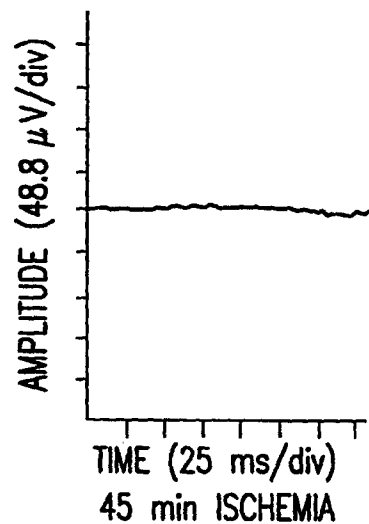


FIG.17B

ELECTRORETINOGRAMS
FROM RATS SUBJECTED
TO 60 MINUTES OF
ISCHEMIA

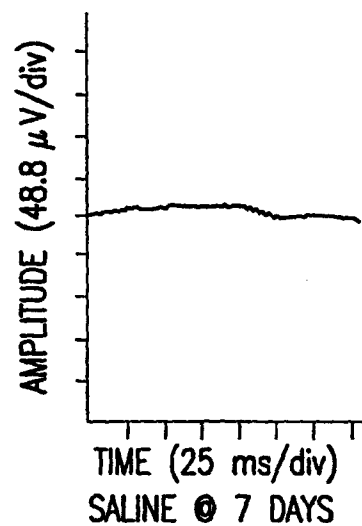


FIG.17C

ELECTRORETINOGRAMS
FROM RATS SUBJECTED
TO 60 MINUTES OF
ISCHEMIA

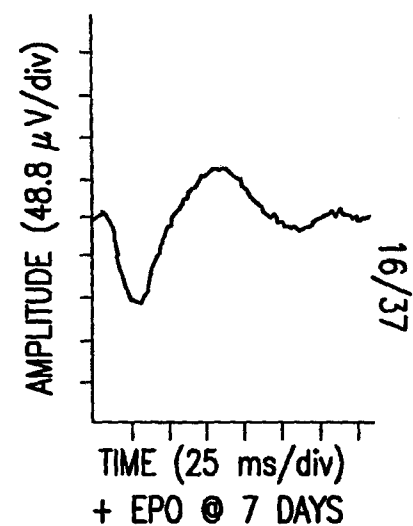


FIG.17D

448
15/37

17/37

451 449
~~124~~

RETINOGRAM AMPLITUDE AFTER 60 min. ISCHEMIA

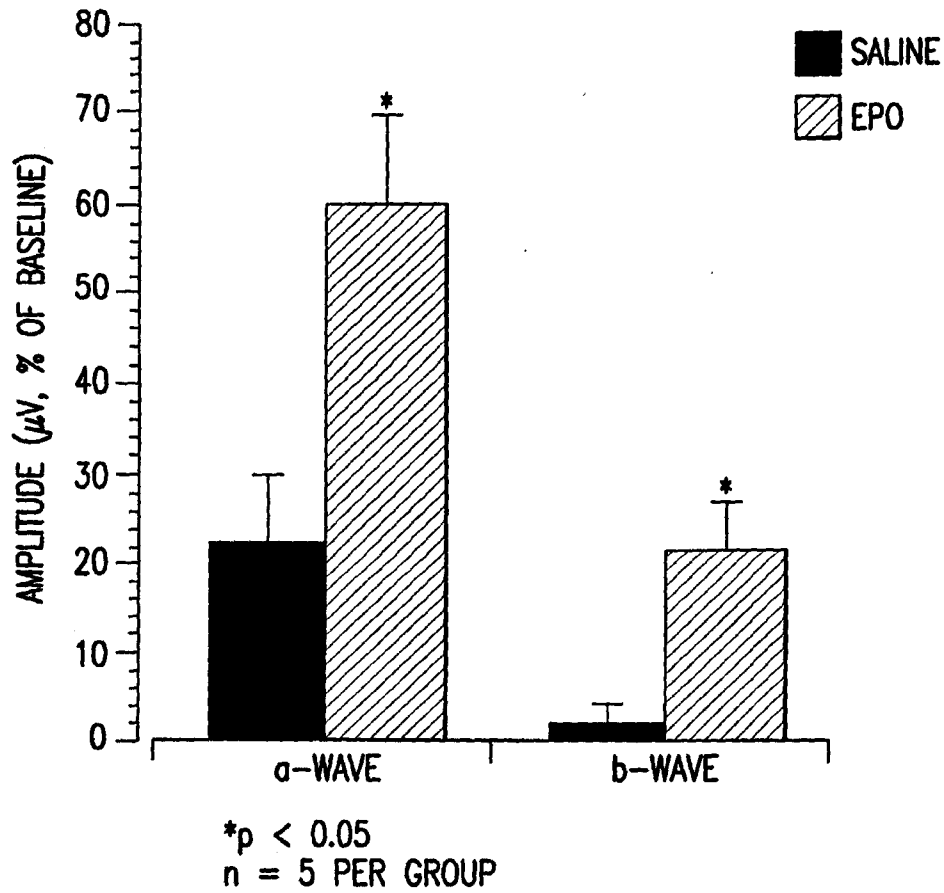
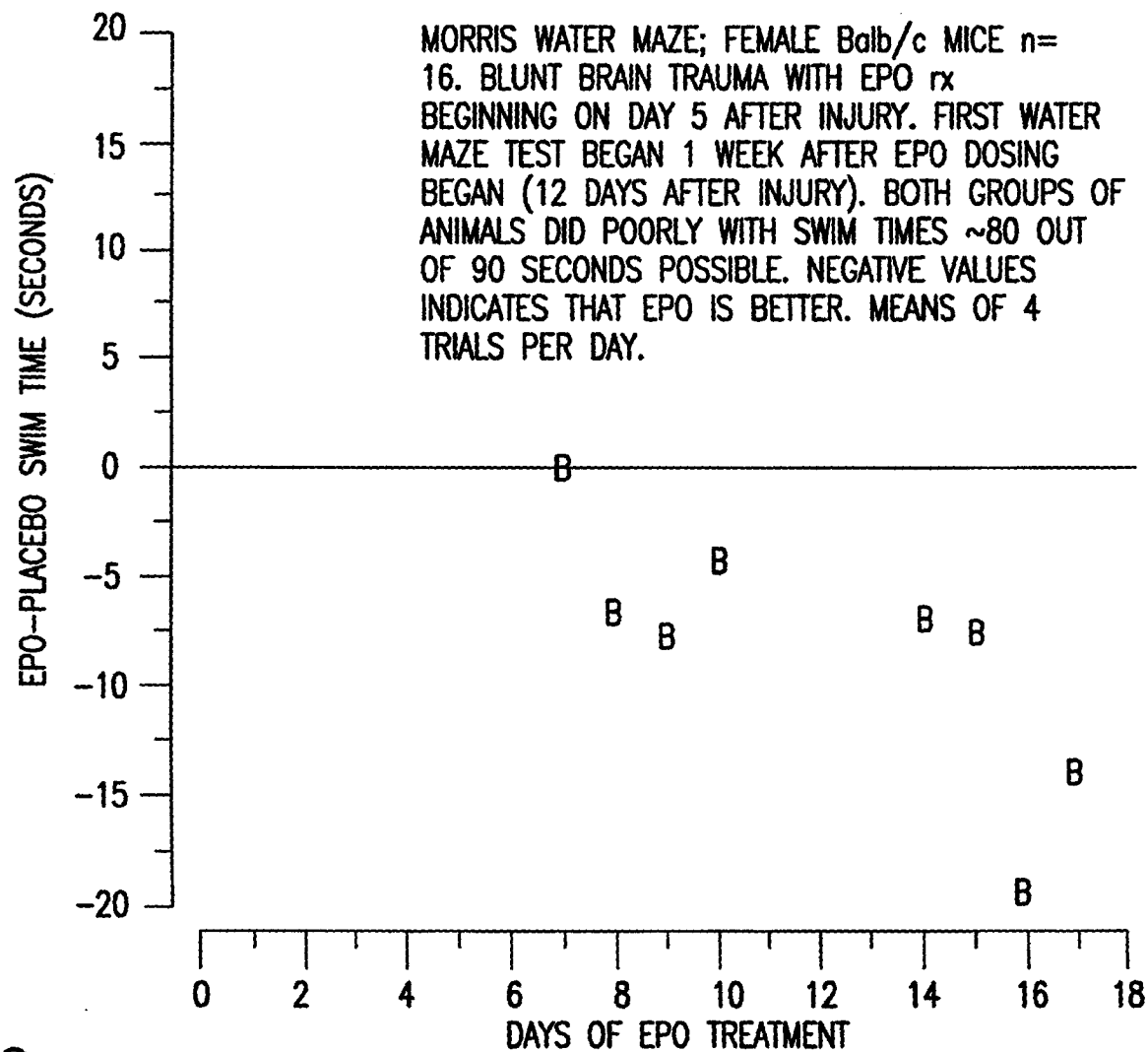


FIG.18

45



18/37

FIG.19

452650
158

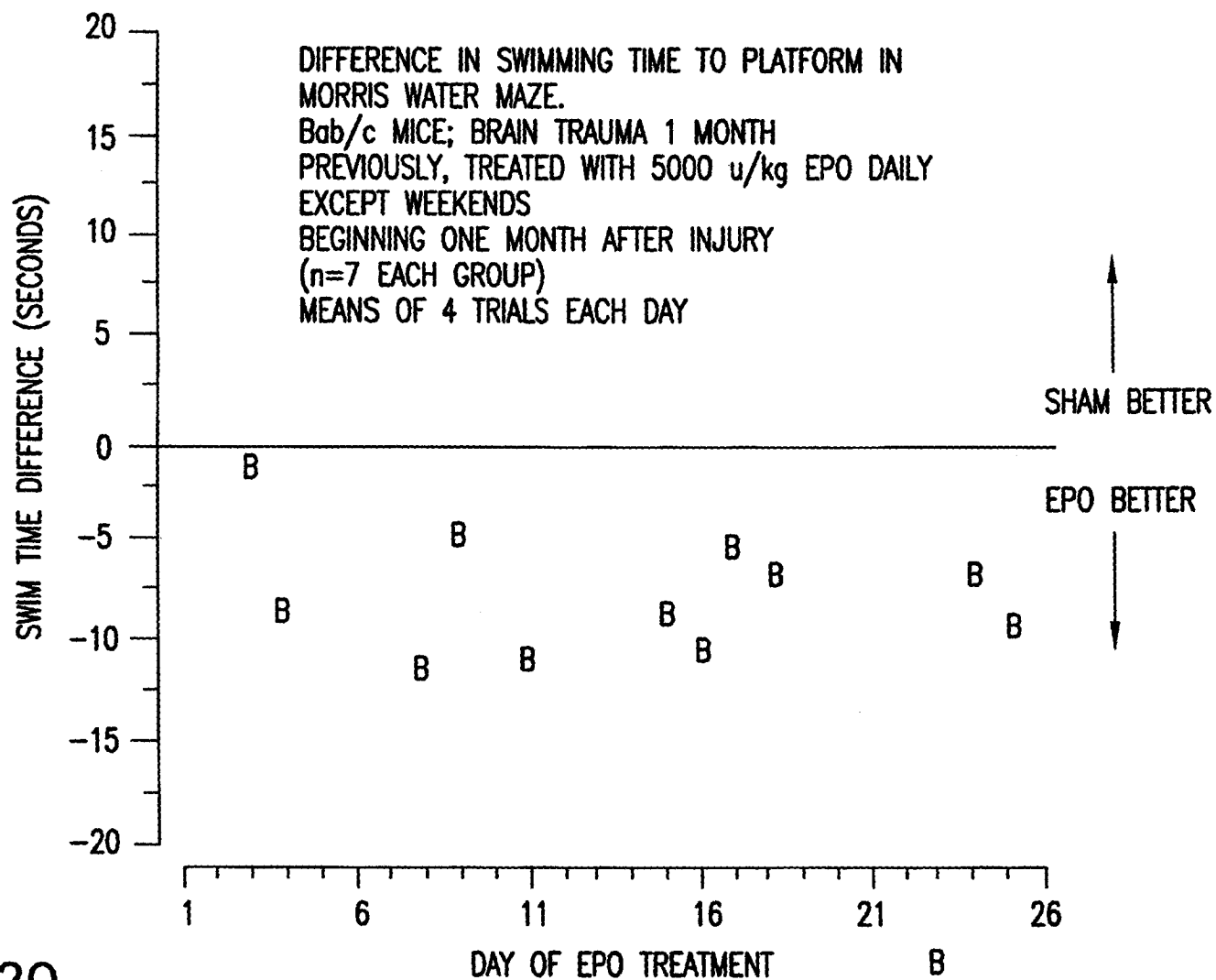


FIG.20

19/37

US 457

457 455
103

23/37

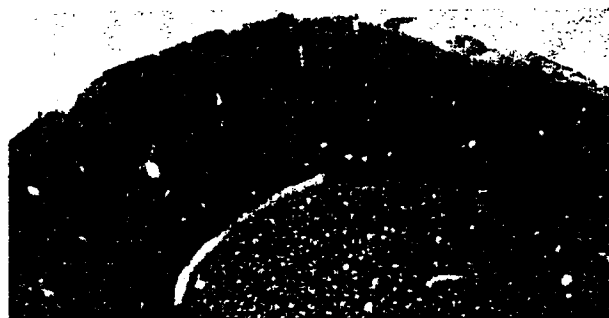


FIG.24A



FIG.24B



FIG.24C

use 45
10/7/8

24/37



FIG.25A



FIG.25B



FIG.25C

459 457
185

25/37



FIG. 26A



FIG. 26B

460 458
~~165~~

26/37

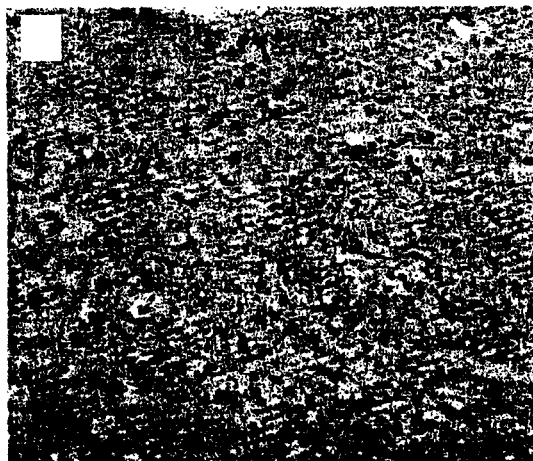


FIG.27A

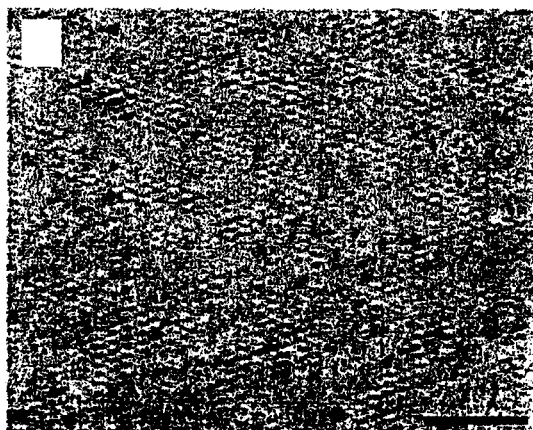


FIG.27B

463 #61
169

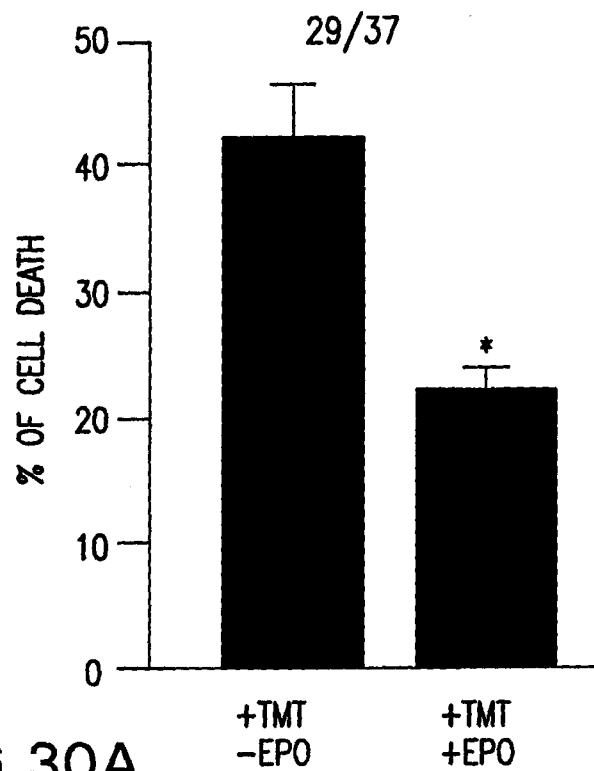


FIG.30A

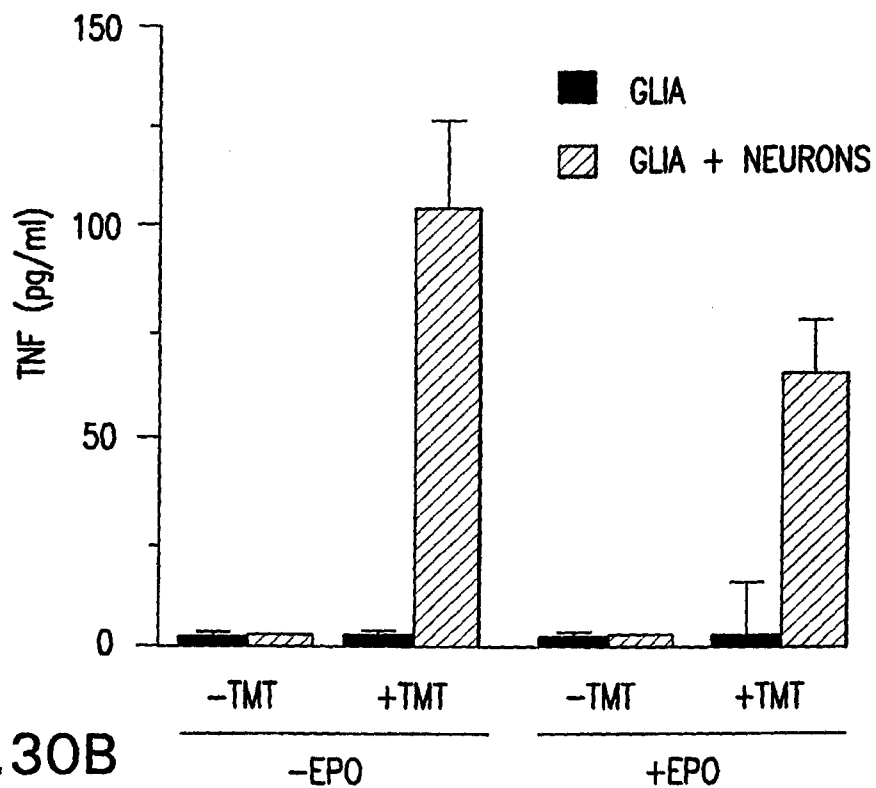


FIG.30B

30/37

NMDA INDUCED CELL DEATH IN
PRIMARY HIPPOCAMPAL NEURONS
COMPOUNDS AT 5nM

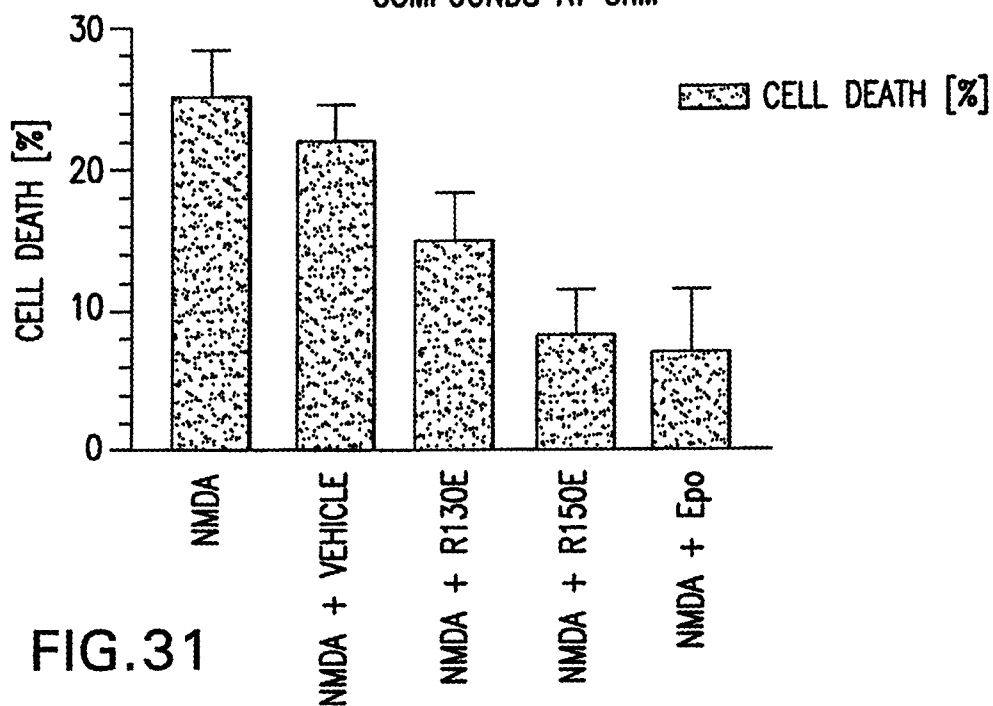


FIG.31

NEURONAL PROTECTION FROM
SERUM WITHDRAWAL IN P19 CELLS

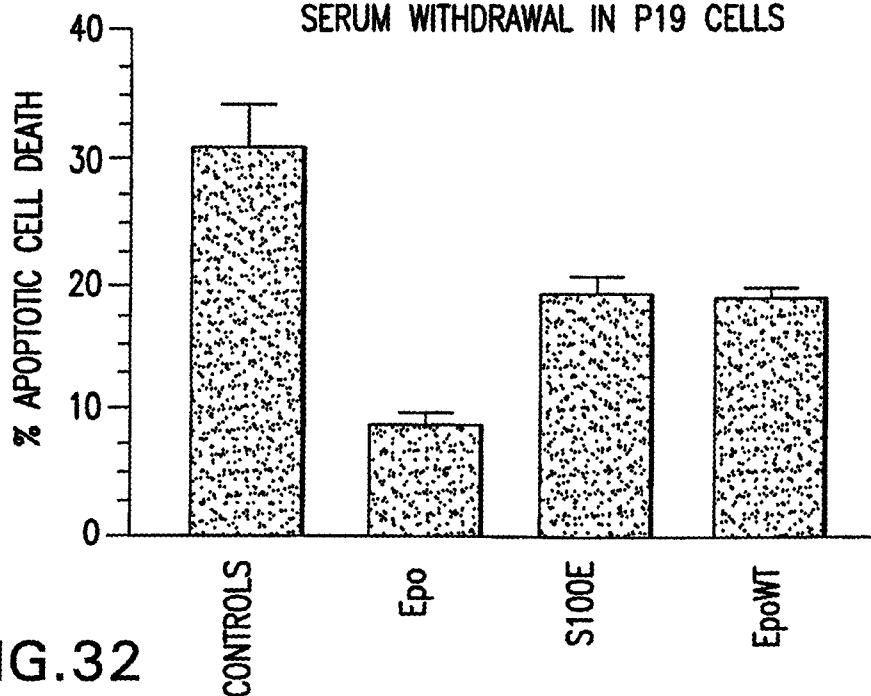


FIG.32

1166 464
42

32/37

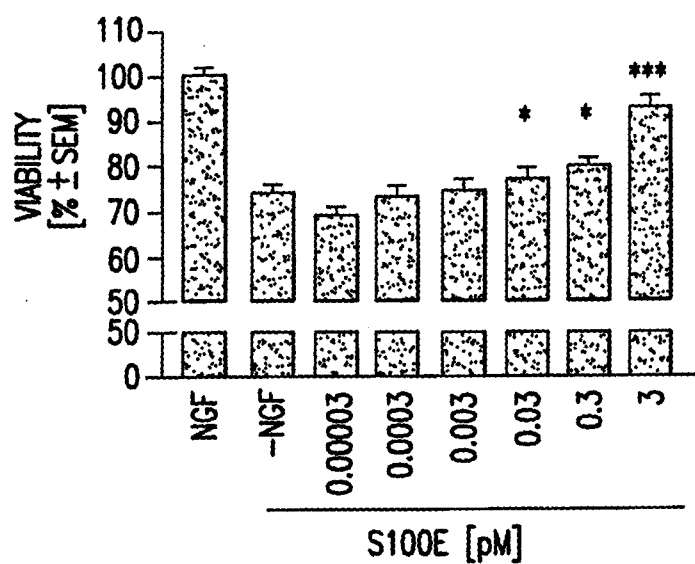


FIG.34A

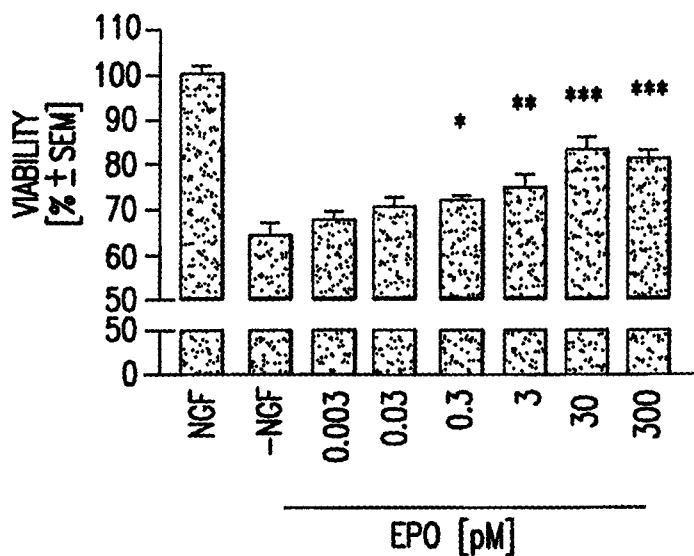
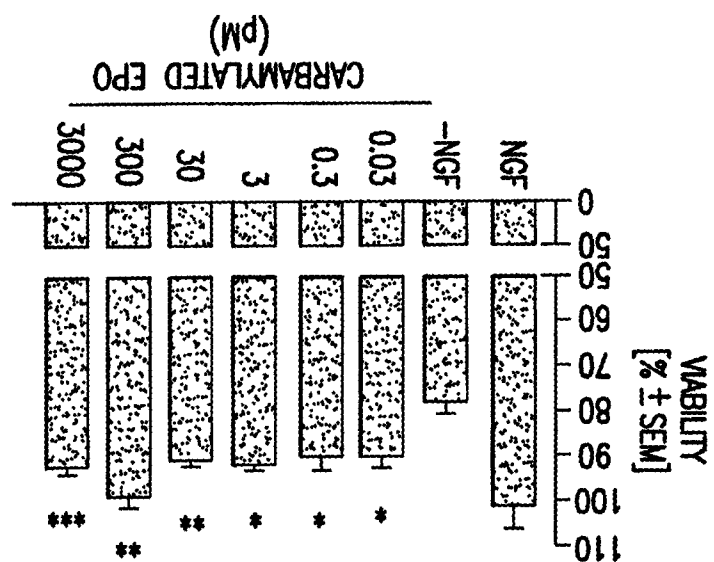


FIG.34B

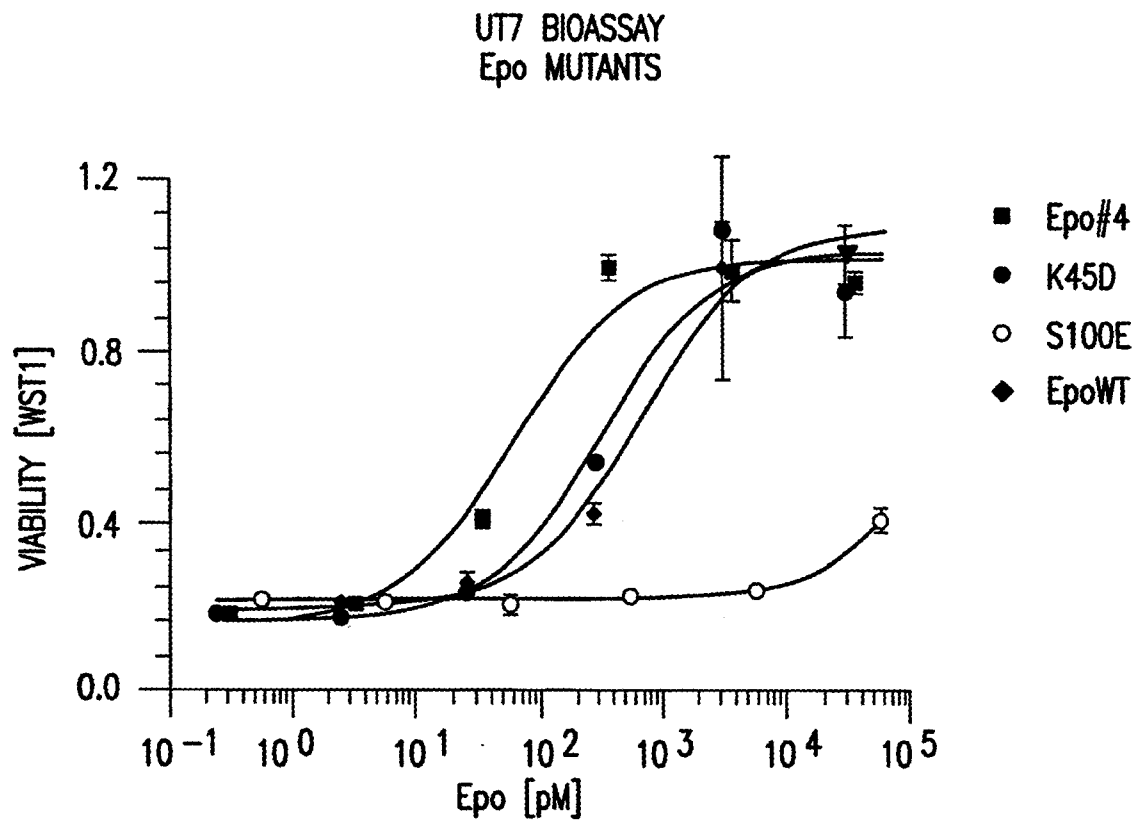
FIG. 34C



33/37

462/465
1/3

4/8



34/37

	Epo#4	K45D	S100E	EpoWT
EC50	58.13	294.0	5.3840e+006	608.0

FIG.35

466

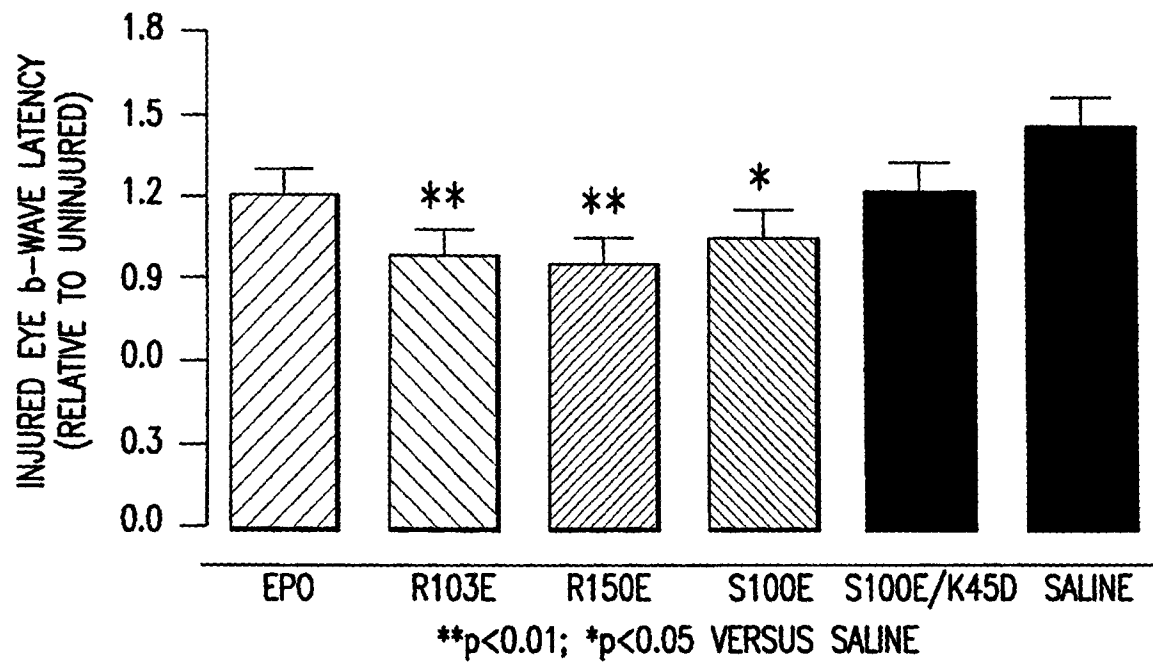


FIG.38

469

472 470
478
478

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTCOMMUNICATION IN CASES FOR WHICH
NO OTHER FORM IS APPLICABLE

To:

CORUZZI, Laura, A.
Jones Day LLP
222 East 41st Street
New York, NY 10017
ETATS-UNIS D'AMERIQUEJUL 30 2007
Tracy Lagrassa

Date of mailing (day/month/year) 17 July 2007 (17.07.2007)	
Applicant's or agent's file reference 10165-22-228 ✓	REPLY DUE see paragraph 1 below
International application No. PCT/US2003/020964 ✓	International filing date (day/month/year) 01 July 2003 (01.07.2003)
Applicant THE KENNETH S. WARREN INSTITUTE, INC. et al	

1. ☐ REPLY DUE within months/days from the above date of mailing
☐ NO REPLY DUE, however, see below
☒ IMPORTANT COMMUNICATION
☐ INFORMATION ONLY

2. COMMUNICATION:

It has been brought to the attention of the International Bureau that in respect of the above-identified international application, page 3/37 of the drawings was omitted in the international publication n° WO 2004/003176 published on 08 January 2004 (08.01.2004).

The International Bureau will publish a corrected version of the published international application.

The International Bureau apologizes for the inconvenience caused.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Martin Jean-Luc e-mail pt01.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 01
---	---

Facsimile No. +41 22 338 87 40

Form PCT/IB/345 (July 1992; reprint January 2004)

I/DBLYGN9B0

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 January 2004 (08.01.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/003176 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 14/505 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

Croton-on-Hudson, NY 10520 (US). CERAMI, Carla;
121 Farrington Avenue, Sleepy Hollow, NY 10591 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2003/020964

(74) Agents: CORUZZI, Laura, A. et al.; Jones Day LLP, 222
East 41st Street, New York, NY 10017 (US).

(22) International Filing Date: 1 July 2003 (01.07.2003)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/392,455 1 July 2002 (01.07.2002) US
60/393,423 3 July 2002 (03.07.2002) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicants: THE KENNETH S. WARREN INSTI-
TUTE, INC. [US/US]; 712 Kitchawan Road, Ossining,
NY 10562 (US). H. LUNDBECK A/S [DK/DK]; Otili-
avej 9, DK-2500 Valby-Copenhagen (DK).

Published:
— with international search report

(72) Inventors: NIELSEN, Jacob; Dannebrogsgade 17,
1.th., DK-1660 Copenhagen (DK). PEDERSEN, Jan,
Torleif; Holcks Plads 14, 1, DK-2700 Bronshøj (DK).
GERWIEN, Jens; Haraldsgade 52, 1.tv, DK-2100 Copen-
hagen (DK). BAY, Katrine; Allersgade 1, 2.th, DK-2100
Copenhagen (DK). PEDERSEN, Lars; Østergaard;
Ved Viglen 14, DK-2400 Copenhagen (DK). LEIST,
Marcel; Kloverbladsgade 14, 1, DK-2500 Valby (DK).
GEIST, Marie; Aavang; Saxtorphsvej 44, DK-2500
Valby (DK). KALLUNKI, Pekka; Classengade 17, 3.th,
DK-2100 Copenhagen (DK). CHRISTENSEN, Søren;
Lysbuaudevej 32, DK-4040 Jyllinge (DK). SAGER,
Thomas; Stormosevej 35, DK-2465 Smørum (DK).
BRINES, Michael; 1 Wepawaug Road, Woodbridge, CT
06525 (US). CERAMI, Anthony; 49 Bramblebush Drive,

(88) Date of publication of the international search report:
28 October 2004

(48) Date of publication of this corrected version:
23 August 2007

(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 34/2007 of 23 August 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: RECOMBINANT TISSUE PROTECTIVE CYTOKINES AND ENCODING NUCLEIC ACIDS THEREOF FOR PRO-
TECTION, RESTORATION, AND ENHANCEMENT OF RESPONSIVE CELLS, TISSUES, AND ORGANS

(57) Abstract: Methods and compositions are provided for protecting or enhancing a responsive cell, tissue, organ or body part
function or viability *in vivo*, *in situ* or *ex vivo* in mammals, including human beings, by systemic or local administration of an ery-
thropoietin receptor activity modulator, such as a recombinant tissue protective cytokine.

WO 2004/003176 A3



US005856298A

United States Patent [19]

Strickland

[11] Patent Number: 5,856,298

[45] Date of Patent: Jan. 5, 1999

[54] ERYTHROPOIETIN ISOFORMS

[75] Inventor: Thomas Wayne Strickland, Moorpark, Calif.

[73] Assignee: Amgen Inc., Thousand Oaks, Calif.

[21] Appl. No.: 334,882

[22] Filed: Nov. 3, 1994

Related U.S. Application Data

[63] Continuation of Ser. No. 942,126, Sep. 8, 1992, abandoned, which is a continuation of Ser. No. 594,448, Oct. 12, 1990, abandoned, which is a continuation-in-part of Ser. No. 421,444, Oct. 13, 1989, abandoned.

[51] Int. Cl.⁶ A61K 38/18; C07K 14/505; C07K 1/18; C07K 1/28

[52] U.S. Cl. 514/8; 530/395; 530/397; 530/412; 530/416; 435/69.4; 204/182.9

[58] Field of Search 530/395, 397, 530/416, 412; 514/8; 435/69.4; 204/182.9

[56] References Cited

U.S. PATENT DOCUMENTS

4,377,513	3/1983	Sugimoto et al.	530/395
4,667,016	5/1987	Lai et al.	435/69.6
4,703,008	10/1987	Lin	435/240.2
4,801,540	1/1989	Hiatt et al.	435/172.3
4,888,282	12/1989	Beremand et al.	435/172.3
5,002,870	3/1991	Leavitt et al.	530/350
5,451,662	9/1995	Naveh et al.	530/416

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

267 678	5/1988	European Pat. Off.
0409113	1/1991	European Pat. Off.

OTHER PUBLICATIONS

Fuhr et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 98: 930-935, Feb. 27, 1981.Viau et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 117: 324-331, Nov. 30, 1983.Havel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 4349-4353, Jul. 1980.
Welch et al., *Journal of Biological Chemistry* 259: 4501-4513, Apr. 1984.Napier et al. "Isoelectric Focussing of Human Urinary Erythropoietin" *IRCS Med. Sci* 4:437 (1976).Andreux et al. "Étude de l'érythropoïétine. . . " *Annales Pharma. Francaises* 31(1):29-36, (1973).Fuhr et al., *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 98: 930-935, Feb. 27, 1981.Viau et al., *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 117: 324-331, Nov/ 30, 1983.Havel et al., *PNAS* 77: 4349-4353, Jul. 1980.Krystal et al., *Blood* 67: 71-79, Jan. 1986.Welch et al., *J. Biol. Chem.* 259: 4501-4513, Apr. 1984.Dordal et al., *Endocrinology* 116: 2293-2299, 1985.Sasaki et al., *J. Biol. Chem.* 262:12059-12076, Sep. 5, 1987.Copsey et al., *Genetically Eng. Human Therap. Drugs*, pp. 25-26, 257, 1988.Dube et al., *J. Biol. Chem.* 263:17516-17521, 25 Nov. 1988.Goldwasser, "Erythropoietin & red cell differentiation", in *Control of Cellular Division and Devel: Part A*, pp. 487-494, 1981.Lukowsky et al., "Studies on the role of Sialic Acid in The physical and Biological Properties of Erythropoietin", *Can. J. Biochem.* 50:909-917, 1972.Ashwell et al. *Methods Enzymol.* 50, 287-288 (1978).Bradford Anal. *Biochem.* 72, 248-254 (1976).Burnette et al. *Anal. Biochem.* 112, 195-203 (1981).Cotes et al. *Nature* 191, 1065-1067 (Sep. 1961).Davis et al. *Biochemistry* 26, 2633-2638 (1987).

(List continued on next page.)

Primary Examiner—Stephen G. Walsh

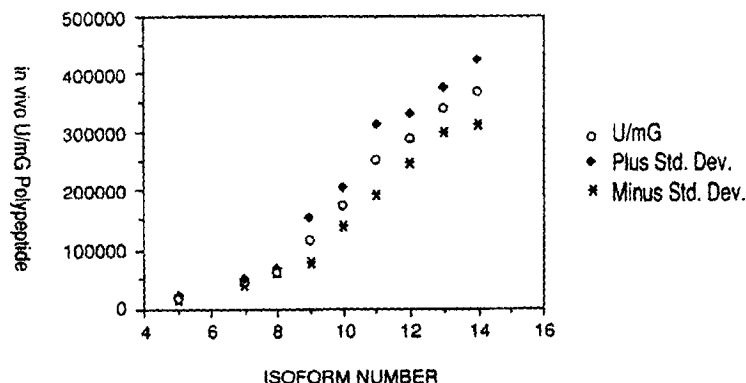
Attorney, Agent, or Firm—Robert B. Winter; Steven M. Odre; Ron K. Levy

[57] ABSTRACT

Erythropoietin isoforms having a specific number of sialic acids per erythropoietin molecule are disclosed. Also disclosed are mixtures of such isoforms, pharmaceutical compositions containing such isoforms or mixtures thereof and methods of obtaining the erythropoietin isoforms.

31 Claims, 13 Drawing Sheets

in vivo U per mG Erythropoietin Polypeptide (Calculated from Radioimmunoassay)



21

26. A method of increasing hematocrit levels in mammals comprising administering a therapeutically effective amount of the composition according to claim 19.

27. A method for obtaining an erythropoietin composition having a predetermined in vivo specific activity comprising preparing a mixture of two or more erythropoietin isoforms of claim 1.

28. The method of claim 27 wherein said mixture consists essentially of at least two isoforms having less than 12 sialic acids per molecule.

22

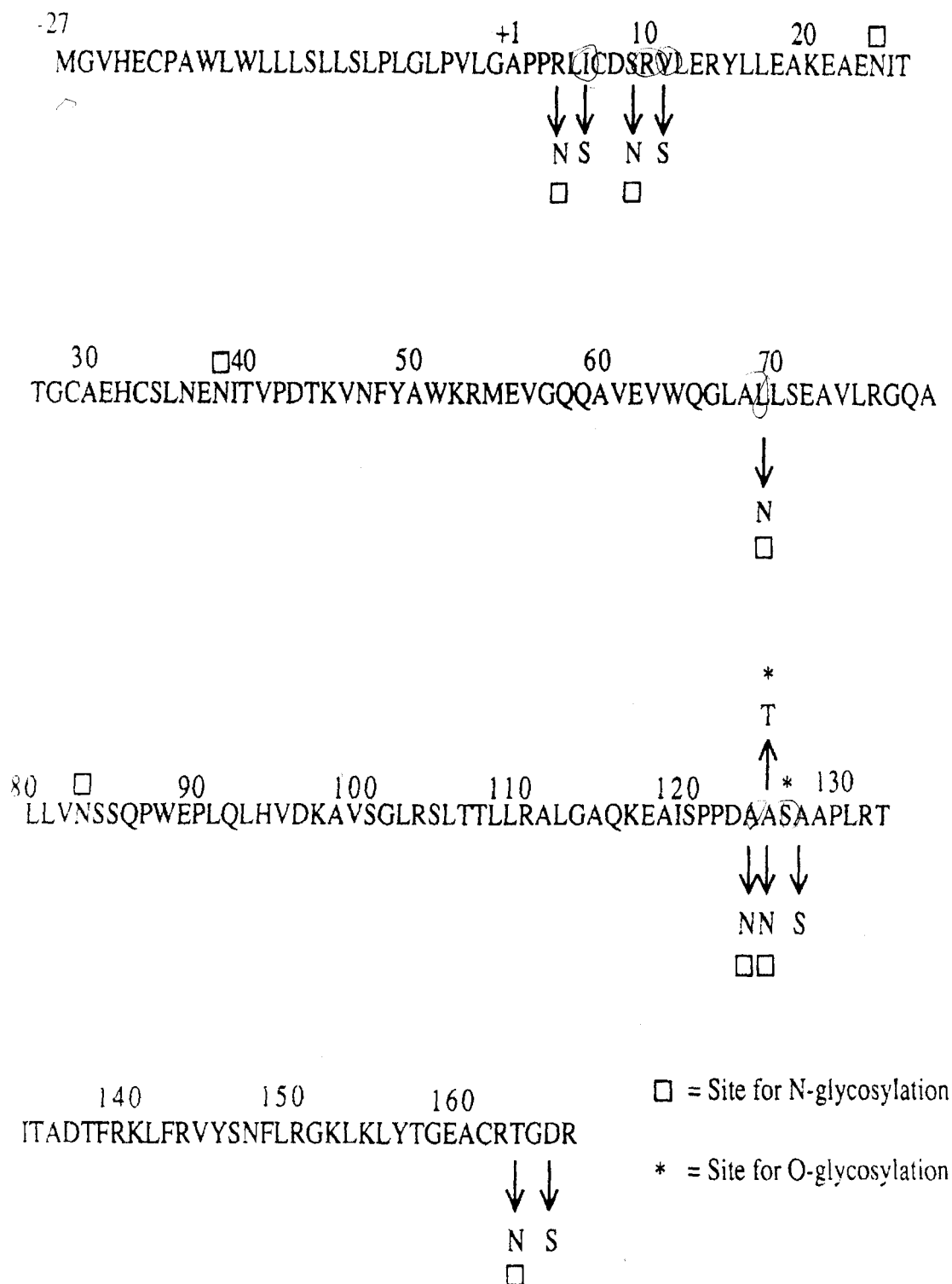
29. The method of claim 28 wherein said mixture consists essentially of erythropoietin isoforms having 9, 10 and 11 sialic acids per molecule.

30. The method of claim 27 wherein said mixture consists essentially of at least two isoforms having greater than 11 sialic acids per molecule.

31. The method as in claim 28 wherein said mixture consists essentially of erythropoietin isoforms having 13 and 14 sialic acids per molecule.

* * * * *

476 ~~476~~
474



ERYTHROPOIETIN ISOFORMS

This application is a continuation, of application Ser. No. 07/942,126, filed Sep. 8, 1992, now abandoned, which is hereby incorporated by reference, which is a continuation of application Ser. No. 07/594,448 filed on Oct. 12, 1990, now abandoned, which is a continuation-in-part application of U.S. application Ser. No. 421,444, filed Oct. 13, 1989, now abandoned, which is incorporated by reference. The present invention relates to erythropoietin isoforms or mixtures thereof, to the methods for the preparation of specific isoforms or mixtures thereof, to pharmaceutical compositions comprising such isoforms or mixtures thereof, and to methods of treatment utilizing such isoforms and compositions.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Erythropoietin is a glycoprotein hormone involved in the maturation of erythroid progenitor cells into erythrocytes. It is essential in regulating levels of red blood cells in circulation. Naturally occurring erythropoietin is produced by the liver during fetal life and by the kidney of adults and circulates in the blood and stimulates the production of red blood cells in bone marrow. Anemia is almost invariably a consequence of renal failure due to decreased production of erythropoietin from the kidney. Recombinant erythropoietin produced by genetic engineering techniques involving the expression of a protein product from a host cell transformed with the gene encoding erythropoietin has been found to be effective when used in the treatment of anemia resulting from chronic renal failure.

Until recently, the availability of erythropoietin has been very limited. Although the protein is present in human urine, excreted levels are too low to make this a practical source of erythropoietin for therapeutic use. Patients suffering from aplastic anemia exhibit elevated levels of urinary erythropoietin relative to healthy individuals, but limited supplies of this urine also make such a source impractical. The purification of human urinary erythropoietin by Miyake et al. in *J. Biol. Chem.*, 252, 5558 (1977), used, as starting material, urine from aplastic anemic individuals.

The identification, cloning, and expression of genes encoding erythropoietin are described in U.S. Pat. No. 4,703,008 to Lin. A description of the purification of recombinant erythropoietin from cell medium that supported the growth of mammalian cells containing recombinant erythropoietin plasmids for example, is included in U.S. Pat. No. 4,667,016 to Lai et al. The expression and recovery of biologically active recombinant erythropoietin from mammalian cell hosts containing the erythropoietin gene on recombinant plasmids has, for the first time, made available quantities of erythropoietin suitable for therapeutic applications. In addition, knowledge of the gene sequence and the availability of larger quantities of purified protein has led to a better understanding of the mode of action of this protein.

The biological activity of a protein is dependent upon its structure. In particular, the primary structure of a protein (i.e., its amino acid sequence) provides information that allows the formation of secondary (e.g., α helix or β -sheet) and tertiary (overall three-dimensional folding) structures by a polypeptide during and after its synthesis. The disruption of proper secondary and tertiary structures by the introduction of mutations or by chemical or enzymatic treatments can result in a reduction in biological activity.

In procaryotic organisms, the biological activities of proteins are largely governed by the structures described above.

Unlike proteins from procaryotic cells, many cell surface and secretory proteins produced by eucaryotic cells are modified with one or more oligosaccharide groups. This modification, referred to as **glycosylation**, can dramatically affect the physical properties of proteins and can also be important in protein stability, secretion, and subcellular localization. Proper glycosylation can be essential for biological activity. In fact, some genes from eucaryotic organisms, when expressed in bacteria (e.g., *E. coli*) which lack cellular processes for glycosylating proteins, yield proteins that are recovered with little or no activity by virtue of their lack of glycosylation.

Glycosylation occurs at specific locations along the polypeptide backbone and is usually of two types: O-linked oligosaccharides are attached to serine or threonine residues while N-linked oligosaccharides are attached to asparagine residues when they are part of the sequence Asn-X-Ser/Thr, where X can be any amino acid except proline. The structures of N-linked and O-linked oligosaccharides and the sugar residues found in each type are different. One type of sugar that is commonly found on both is N-acetylneuraminic acid (hereafter referred to as sialic acid). Sialic acid is usually the terminal residue of both N-linked and O-linked oligosaccharides and, by virtue of its negative charge, may confer acidic properties to the glycoprotein.

Both human urinary derived erythropoietin and recombinant erythropoietin (expressed in mammalian cells) having the amino acid sequence 1-165 of human erythropoietin contain three N-linked and one O-linked oligosaccharide chains which together comprise about 40% of the total molecular weight of the glycoprotein. N-linked glycosylation occurs at asparagine residues located at positions 24, 38 and 83 while O-linked glycosylation occurs at a serine residue located at position 126 (Lai et al. *J. Biol. Chem.* 261, 3116 (1986); Broudy et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 265, 329 (1988)). The oligosaccharide chains have been shown to be modified with terminal sialic acid residues. Enzymatic treatment of glycosylated erythropoietin to remove all sialic acid residues results in a loss of in vivo activity but does not affect in vitro activity (Lowy et al. *Nature* 185, 102 (1960); Goldwasser et al. *J. Biol. Chem.* 249, 4202 (1974)). This behavior has been explained by rapid clearance of asialo-erythropoietin from circulation upon interaction with the hepatic asialoglycoprotein binding protein (Morrell et al. *J. Biol. Chem.* 243, 155 (1968); Briggs, et al. *Am. J. Physiol.* 227, 1385 (1974); Ashwell et al. *Methods Enzymol.* 50, 287 (1978)). Thus, erythropoietin possesses in vivo biological activity only when it is sialylated to avoid its binding by the hepatic binding protein.

The role of the other components in the oligosaccharide chains of erythropoietin is not well defined. It has been shown that non-glycosylated erythropoietin has greatly reduced in vivo activity compared to the glycosylated form but does retain in vitro activity (Dordal et al. *Endocrinology* 116, 2293 (1985); Lin patent, supra). In another study, however, the removal of N-linked or O-linked oligosaccharide chains singly or together by mutagenesis of asparagine or serine residues that are glycosylation sites sharply reduces in vitro activity of the altered erythropoietin that is produced in mammalian cells (Dube et al. *J. Biol. Chem.* 263, 17516 (1988)).

Glycoproteins such as erythropoietin can be separated into different charged forms using techniques such as isoelectric focusing (IEF). Several parties have reported IEF studies of crude and partially purified erythropoietin preparations (Lukowsky et al., *J. Biochem* 50, 909 (1972); Shelton et al. *Biochem. Med.* 12, 45 (1975); Fuhr et al. *Biochem.*

Biophys. Res. Comm. 98, 930 (1981)). At most, three or four fractions having erythropoietin activity were distinguished by IEF in these studies and none were characterized with respect to carbohydrate content. In addition, no correlation between the isoelectric points of the fractions and their biological activity was made.

During the purification of urinary erythropoietin from human urine discussed in Miyake et. al. supra, two erythropoietin fractions from hydroxylapatite chromatography designated II and IIIA were reported to have the same specific activity. A subsequent carbohydrate analysis of fractions II and IIIA revealed that fraction II had a greater average sialic acid content than fraction IIIA (Dordal et. al. supra).

It is an object of the present invention to provide separated and isolated isoforms of erythropoietin having a defined sialic acid content and biological activity. Pharmaceutical compositions containing such molecules would have therapeutic benefit.

SUMMARY OF THE INVENTION

The subject invention relates to erythropoietin isoforms. Also provided is a method of preparing an erythropoietin isoform comprising the steps of subjecting purified erythropoietin to preparative isoelectric focusing, and eluting a single isoform from the gel. Pharmaceutically acceptable compositions comprising erythropoietin isoforms are also provided. This invention also relates to methods of increasing hematocrit levels in mammals comprising administering a therapeutically acceptable amount of these compositions to increase production of reticulocytes and red blood cells.

The subject invention relates to a method of preparing a mixture of erythropoietin molecules having greater than or alternatively less than a predetermined number of sialic acids per molecule comprising subjecting material containing erythropoietin to ion exchange chromatography. Also comprised by the subject invention is a method of preparing a mixture of erythropoietin molecules having greater than or alternatively less than a predetermined number of sialic acids per molecule comprising subjecting a material containing erythropoietin to chromatofocusing.

The invention also comprises analogs of human erythropoietin having a greater number of sites for carbohydrate chain attachment than human erythropoietin, such as [Asn⁶⁹] EPO; [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO; [Thr¹²⁵] EPO; and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 shows an analytical isoelectric focusing gel of the separate recombinant erythropoietin isoforms. Gel lanes 1-11 show isoforms ranging from less acidic (higher pI) in lane 1 to more acidic (lower pI), in lane 11. Purified recombinant erythropoietin containing a mixture of isoforms 9-14 is also shown in the far left and right lanes of the gel.

FIG. 2A, FIG. 2B and FIG. 2C show the relationship between the number of sialic acids per erythropoietin isoform and the in vivo specific activity of each isoform expressed as units per mg of erythropoietin polypeptide. In FIG. 2A, the concentration of each erythropoietin isoform was determined by the Bradford protein assay; in 2B, the concentration was determined by absorbance at 280 nm, in 2C, the concentration was determined by RIA.

FIG. 3 shows an analytical isoelectric focusing gel of defined mixtures of recombinant erythropoietin isoforms prepared by anion exchange chromatography under different

conditions. Gel lanes 1-6 represent, respectively, erythropoietin isoforms eluted in a high salt wash after washing the Q-Sepharose fast flow column with 150 mM acetic acid, pH 4.7, 150 mM acetic acid (unbuffered), 200 mM acetic acid, pH 4.7, 250 mM acetic acid, pH 4.7, 300 mM acetic acid, pH 4.7 or 300 mM acetic acid (unbuffered). Purified recombinant erythropoietin containing a mixture of isoforms as obtained using procedures described in Example 2 of Lai et al., supra, except that DEAE-Agarose chromatography is replaced by Q-Sepharose chromatography, is also shown in the far left lane of the gel.

FIG. 4 shows the separation of erythropoietin isoforms 8 to 12 achieved by subjecting cell conditioned medium applied to a column of Q-Sepharose to a gradient of decreasing pH and increasing ionic strength. Aliquots of even numbered fractions from Fraction 2 to Fraction 40 were subjected to analytical isoelectric focusing. Purified recombinant erythropoietin containing a mixture of isoforms obtained using procedures described in Example 2 of Lai et al. supra, except that DEAE-Agarose chromatography is replaced by Q-Sepharose chromatography, is also shown in the far left lane of the gel.

FIG. 5 shows the amino acid sequence of human erythropoietin. Squares indicate asparagine residues to which carbohydrate chains are attached and asterisks indicate threonine and serine residues modified with carbohydrate. Additional glycosylation sites provided in the analogs of Example 6 are indicated by mutations to asparagine serine, and threonine.

FIG. 6A, FIG. 6B, and FIG. 6C show the series of cloning steps used in generating plasmids for the construction and analysis of analogs of human erythropoietin. These analogs have amino acids altered as shown in FIG. 5 which provide additional glycosylation sites.

FIG. 7 shows a Western blot analysis of COS cell supernatants of human sequence erythropoietin and indicated erythropoietin analogs. The analogs [Asn⁹, Ser¹¹], EPO, [Asn⁶⁹] EPO, [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO, and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO are constructed as described in Example 6. The analogs [Pro¹²⁵, Thr¹²⁷] EPO, [Asn¹²⁶, Ser¹²⁸] EPO and [Thr¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO which do not contain additional carbohydrate chains are shown for comparison.

FIG. 8 shows a Western blot analysis of COS cell supernatants of human sequences erythropoietin and indicated erythropoietin analogs after treatment with N-glycanase. The analogs [Thr¹²⁵] EPO and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO are constructed as described in Example 6. The analogs [Val¹²⁶] EPO, [Pro¹²⁴] EPO, [Pro¹²⁵] EPO, [Thr¹²⁷] EPO, [Pro¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO and [Thr¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO are shown for comparison.

FIG. 9 shows an isoelectric focusing gel of pools 2, 3 and 4 obtained by Q-Sepharose and C4 reverse phase chromatography of cell medium that supported the growth of CHO cells transfected with erythropoietin cDNA containing the [Thr¹²⁵] mutation. Purified recombinant erythropoietin containing a mixture of isoforms are obtained using procedures described in Example 2 of Lai et al., supra, except that DEAE-Agarose chromatography is replaced by Q-Sepharose chromatography, is also shown in the left and right lanes of the gel.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

According to the present invention, erythropoietin isoforms are provided. Isoelectric focusing (IEF) separates proteins on the basis of charge. When placed in a pH

gradient and subjected to an electric field, proteins will migrate to the point at which they have no net charge and remain there. This is the isoelectric point (pI) of the protein. Each distinct band observed on IEF represents molecules that have a particular pI and therefore the same overall charge, and is termed an isoform. The term "erythropoietin isoform" as used herein refers to erythropoietin preparations having a single pI, and having the same amino acid sequence.

In a preferred embodiment the erythropoietin is the product of the expression of an exogenous DNA sequence that has been transfected into a non-human eucaryotic host cell, that is, in a preferred embodiment the erythropoietin is "recombinant erythropoietin". Recombinant erythropoietin is advantageously produced according to the procedures described in commonly owned Lin U.S. Pat. No. 4,703,008 hereby incorporated by reference. Recombinant erythropoietin is advantageously purified according to the general procedures described in Example 2 of commonly owned Lai et al. U.S. Pat. No. 4,667,016 hereby incorporated by reference, or alternatively the procedure described in Example 2 wherein DEAE-Agarose chromatography is replaced by Q-Sepharose chromatography. In the Q-Sepharose column modification, 55 mM NaCl replaces 25 mM NaCl in the buffer solution used to bring the column to neutral pH, and 140 mM NaCl replaces 75 mM NaCl in the buffer solution used to elute erythropoietin from the column. This material, when analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, migrates as a single species (i.e. band). When purified erythropoietin is subjected to IEF, multiple bands in the gel are apparent, indicating that different charged forms of the glycoprotein are present.

It has been found that discrete isoforms of recombinant erythropoietin having the amino acid sequence of urinary derived human erythropoietin correspond to erythropoietin molecules having from 1-14 sialic acids, and each isoform present in purified recombinant erythropoietin has an in vivo activity which is related to the number of sialic acids the isoform possesses. The term "erythropoietin", as used herein, includes naturally occurring erythropoietin, urinary derived human erythropoietin as well as non-naturally occurring polypeptides having an amino acid sequence and glycosylation sufficiently duplicative of that of naturally occurring erythropoietin to allow possession of in vivo biological properties of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells.

Crude preparations of erythropoietin have many isoforms but material purified for example, as in the Lai et al. patent supra Example 2, contains predominantly six isoforms when analyzed by IEF. In addition, at least one additional isoform of greater acidity has been detected using the chromatographic procedures described in Example 4. (This more acidic form, migrating at >14 sialic acids on an IEF gel may contain nonsialic acid negative charges as shown by the resistance of some of the charge to sialidase digestion). These isoforms differ from each other by sialic acid content. As shown in the Examples, this is demonstrated by isolating 10 of these isoforms by preparative IEF and determining the sialic acid content of five of them. Of the isoforms assayed for sialic acid content, it is found that the five isoforms contained either 9, 10, 11, 12 or 13 sialic acid residues.

There is a relationship between the relative in vivo specific activity of erythropoietin and number of sialic acid residues per erythropoietin molecule from the isoforms 5 through 11 (each isoform is designated herein by the number of sialic acids per erythropoietin molecule). Isoforms 11 through 14 have approximately the same relative in vivo

specific activity. Isoforms 5-14 are assayed for in vivo activity by the exhypoxic polycythemic mouse bioassay and the amount of each isoform present is determined by Bradford protein assay, absorbance at 280 nm or by radioimmunoassay (RIA) for erythropoietin. RIA determinations (Egrie et al. Immunobiology 172, 213, (1986)), expressed as units/ml, are divided by 212,770 units/mg erythropoietin polypeptide, the average specific activity of purified erythropoietin as determined by RIA, to give protein concentrations of isolated isoforms or isoform mixtures expressed as mg erythropoietin polypeptide/ml. As shown in the Examples, the relative in vivo specific activities increase step-wise from isoform 5 to isoform 11 (see Table 2).

The in vivo specific activities referred to herein are measurements of relative in vivo specific activities and are not measurements of absolute in vivo specific activities. For the purposes of this application, the specific activities are used only to compare relative activities of isoforms that have been assayed using the same assay, using the same conditions including the same internal standard, the same type of animals, having the same analysis of the data used to calculate specific activity, the same assay for determining protein content. It is not intended that any in vivo specific activity value reported for any isoform represents an inherent or absolute value for that isoform.

The subject invention provides erythropoietin isoforms. The specific isoforms of erythropoietin obtained in accordance with the present invention, and their properties, may vary depending upon the source of the starting material. For example, the isoforms of urinary derived human erythropoietin are different than the isoforms of recombinant erythropoietin. In a preferred embodiment, the invention relates to an erythropoietin isoform having a specific number (i.e. a fixed number greater than 0) of sialic acids per erythropoietin molecule, said number selected from the group consisting of 1-14. Advantageously said number is 9, 10, 11, 12, 13, or 14. In another embodiment, said number is greater than 14, advantageously 16-23.

This invention also provides compositions comprising two or more erythropoietin isoforms. In one embodiment the compositions comprise a mixture of isoforms having greater than a predetermined number of sialic acids per erythropoietin molecule, e.g. greater than 11 sialic acids per erythropoietin molecule, or greater than 12 sialic acids per molecule, e.g. a mixture of isoforms 12, 13 and 14. In another embodiment the compositions comprise mixtures of isoforms having a predetermined number of sialic acids per erythropoietin molecule, e.g. less than 12, but greater than 8 sialic acids per molecule as in, for example, a mixture of isoforms 9, 10, and 11. The invention also provides for compositions of erythropoietin isoforms wherein the relative amounts of the isoforms are the same or different. For example, a mixture of isoforms 9, 10 and 11 could have the isoforms present in a variety of ratios such as 1:1:1, 2:3:1 or 20:20:1.

Advantageously, the compositions comprise mixtures of less than four isoforms, for example a mixture of isoforms 11, 12, and 13, or a mixture of 12 and 14, or a mixture of 7 and 13.

In order to produce mixtures of erythropoietin isoforms, this invention also provides methods of isolating selected erythropoietin isoforms simultaneously. These methods include isolation of individual isoforms by techniques such as preparative isoelectric focusing or preparation of mixtures of isoforms having a predetermined number of sialic acids per molecule (for example, greater than 11) by techniques

476
478 476

such as ion exchange chromatography or chromatofocusing. All of these techniques have as their basis the separation of proteins according to charge.

In general, ion exchange chromatography and chromatofocusing involve application of either crude human erythropoietin (cell conditioned media) or purified material to a column resin under conditions that permit binding of some or all of the erythropoietin isoforms to the resin. For crude erythropoietin preparations, it is preferable to apply the protein to the column at about pH 7 while for purified preparations the protein can be applied to the column at pH 7 down to about pH 4. After washing the column with buffer at about pH 4, those erythropoietin isoforms that remain bound on the ion exchange column are eluted by increasing the pH and the salt concentration of the buffer or by applying a gradient of decreasing pH and increasing ionic strength at about pH 4. For chromatofocusing, the isoforms are eluted from the column by a gradient of decreasing pH or by washing the column with a high concentration of salt.

One embodiment of the invention relates to mammalian (e.g., Chinese Hamster Ovary, CHO) host cells which preferentially synthesize erythropoietin isoforms having greater than a specific number, e.g. greater than 10 sialic acids per molecule. Erythropoietin molecules have N-linked or O-linked oligosaccharides structures which can limit the sialic acid content of the molecule. For example, tetraantennary (four-branched) N-linked oligosaccharides most commonly provide four possible sites for sialic acid attachment while bi- and triantennary oligosaccharide chains, which can substitute for the tetraantennary form at asparagine-linked sites, commonly have at most only two or three sialic acids attached. O-linked oligosaccharides commonly provide two sites for sialic acid attachment. Thus, erythropoietin molecules can accommodate a total of 14 sialic acid residues provided all three N-linked oligosaccharides are tetraantennary. Mammalian cell cultures are screened for those cells that preferentially add tetraantennary chains to recombinant erythropoietin, thereby maximizing the number of sites for sialic acid attachment.

The N-linked oligosaccharides of urinary erythropoietin contain sialic acid in both an α 2,3 and an α 2,6 linkage to galactose (Takeuchi et al. *J. Biol. Chem.* 263, 3657(1988)). Typically the sialic acid in the α 2,3 linkage is added to galactose on the mannose α 1,6 branch and the sialic acid in the α 2,6 linkage is added to the galactose on the mannose α 1,3 branch. The enzymes that add these sialic acids (β -galactoside α 2,3 sialyltransferase and β -galactoside α 2,6 sialyltransferase) are most efficient at adding sialic acid to the mannose α 1,6 and mannose α 1,3 branches respectively.

Dihydrofolate reductase (DHFR) deficient Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are a commonly used host cell for the production of recombinant glycoproteins including recombinant erythropoietin. These cells do not express the enzyme β -galactoside α 2,6 sialyltransferase and therefore do not add sialic acid in the α 2,6 linkage to N-linked oligosaccharides of glycoproteins produced in these cells. (Mutsaers et al. *Eur. J. Biochem.* 156, 651 (1986); Takeuchi et al. *J. Chromatogr.* 400, 207 (1987)). Consequently, recombinant erythropoietin produced in CHO cells lacks sialic acid in the 2,6 linkage to galactose (Sasaki et al. (1987), *supra*; Takeuchi et al. (1987), *supra*). In another embodiment of the subject invention, the erythropoietin used to produce the isoforms is made in CHO cells that are transfected with a functional β -galactoside α 2,6 sialyltransferase gene to give incorporation of sialic acid in α 2,6 linkage to galactose. See Lee et al. *J. Biol. Chem.* 264, 13848 (1989), hereby

incorporated by reference, for a disclosure of techniques for creating modified CHO cells or other mammalian host cells.

Also encompassed by the invention are certain analogs of human erythropoietin. As used herein the phrase "analog of human erythropoietin" refers to erythropoietin with one or more changes in the amino acid sequence of human erythropoietin which result in an increase in the number of sites for sialic acid attachment. Analogs are generated by site-directed mutagenesis having additions, deletions, or substitutions of amino acid residues that alter sites that are available for glycosylation. Such analogs have a greater number of carbohydrate chains than human erythropoietin.

Analogs that result in increased biological activity are constructed by increasing the sialic acid content of the erythropoietin molecule. Analogs having levels of sialic acid greater than that found in human erythropoietin are generated by adding glycosylation sites which do not perturb the secondary or tertiary conformation required for biological activity. Advantageously, the analog of human erythropoietin has 1, 2 or 3 additional sites for N-glycosylation or O-glycosylation. For example, a leucine at position 69 is replaced by an asparagine to give the sequence Asn-Leu-Ser, which serves as a fourth site for N-glycosylation. Such a change can commonly provide up to four additional sialic acids per molecule. Examples of other changes that generate additional N- or O-glycosylation sites are alanines at positions 125 and 127 to asparagine and serine, respectively, alanine at position 125 to threonine and alanines at positions 124 and 125 to proline and threonine, respectively. As will be appreciated by those skilled in the art, the subject invention includes many other analogs of human erythropoietin having additional sites for glycosylation.

Also comprehended by the invention are pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of a specific isoform or mixture of isoforms together with a suitable diluent, adjuvant and/or carrier useful in erythropoietin therapy. A "therapeutically effective amount" as used herein refers to that amount which provides therapeutic effect for a given condition and administration regimen. The administration of erythropoietin isoforms is preferably by parental routes. The specific route chosen will depend upon the condition being treated. The administration of erythropoietin isoforms is preferably done as part of a formulation containing a suitable carrier, such as human serum albumin, a suitable diluent, such as a buffered saline solution, and/or a suitable adjuvant. The required dosage will be in amounts sufficient to raise the hematocrit of patients and will vary depending upon the severity of the condition being treated, the method of administration used and the like.

The following examples are offered to more fully illustrate the invention, but are not to be construed as limiting the scope thereof. The erythropoietin standard used in the *in vivo* bioassays employed in the Examples is a recombinant erythropoietin standard that was standardized against a partially purified urinary erythropoietin standard. Thus, only relative *in vivo* specific activities are being measured. Also the *in vivo* specific activities are expressed in "units/ml", "units/mg" and units/ A_{280} and not as "IU/ml", "IU/mg" and IU/ A_{280} , because the erythropoietin standard employed has not been directly correlated to any existing international standard.

EXAMPLE 1

Isolation of Recombinant Erythropoietin Isoforms

Recombinant erythropoietin is produced as described in Lin, *supra*. Recombinant erythropoietin used as starting

material for the first and third isoform isolations is purified according to the procedure described in Example 2 of commonly owned Lai et al., supra. Starting material for the second and fifth isoform isolation is purified according to Lai et al. supra using the modification of Q-Sepharose chromatography. These preparations contain a mixture of isoforms of recombinant erythropoietin having the same amino acid sequence as urinary derived human erythropoietin and contain predominantly isoforms 9 to 14. Starting material for the fourth isoform preparation is the material which elutes during the 5 mM acetic acid/1 mM glycine/6M urea wash of the anion exchange column in Example 2 of Lai et al. This fraction contains isoforms with less than or equal to 9 sialic acids and was further purified by gel filtration chromatography as described in Example 2 of Lai et al. prior to use in the preparative isoelectric focusing procedure. The sixth isoform preparation used as its starting material a purified preparation of recombinant erythropoietin having from 4 to 13 sialic residues. This material was purified as per Example 2 of Lai et al. except for a modification to the ion exchange column (elution of the recombinant erythropoietin with a sodium chloride gradient at pH 8.4 and omission of the acetic acid/urea wash) which results in retention of most of the isoforms present in the starting material.

Six different preparations of individual isoforms are carried out by preparative isoelectric focusing in a granulated gel bed (Ultradex, LKB) essentially as per LKB Application Note 198. Pharmalyte (Pharmacia) 2.5-5 ampholytes (Pharmacia) are used and the gel bed contains 5M urea.

In the first preparation, approximately 20 mg of recombinant erythropoietin in 6.8 ml of 20 mM sodium citrate/100 mM sodium chloride, pH 7.0 are applied to the gel and focused at 8 watts for approximately 16 hours. After isoelectric focusing, the isoform bands in the gel are visualized by a paper contact print of the gel bed. The print is made and then fixed by soaking in 3 changes (approximately 10 minutes each, room temperature) of fixing solution (40% methanol/10% acetic acid/10% TCA/3.5% sulfosalicylic acid), subjected to one change (approximately 10 minutes) of 40% methanol/10% acetic acid (30°-60° C.), stained for 15 minutes at 60° C. in 0.125% Coomassie Blue R-250/40% methanol/10% acetic acid, and then destained in 7.5% methanol/10% acetic acid in order to visualize the separated isoforms. The region of the granulated gel bed containing the isoforms (~50% of the resin) is removed, water is added (~16 ml), and the slurry is poured into a 5.5x24.5 inch tray and evaporated to ~40 g net weight. This preparation is focused for a second time and a contact print of the gel bed is made as before. The portion of gel containing each of the six discernible isoforms is removed from the gel bed.

In order to elute the isoforms from the gel, a solution containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.0/5 mM Chaps is added to each isoform to generate a slurry. The slurries are placed in small columns and washed with the Tris-Chaps buffer. The flow throughs are collected and applied separately to small columns (open column configuration) containing Vydac C4 reversed phase resin equilibrated in 20% ethanol/10 mM Tris-HCl, pH 7.0. The columns are developed stepwise with 20% ethanol/10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 35% ethanol/10 mM Tris-HCl, pH 7.0, and 65% ethanol/10 mM Tris-HCl, pH 7.0. The fraction eluting at 65% ethanol/10 mM Tris is diluted 1:1 with 10 mM Tris-HCl, pH 7.0 and subjected to concentration and then buffer exchanged to 10 mM Tris-HCl, pH 7.0 using a Centricon-10 (Amicon) micro-concentrator. Analytical isoelectric focusing of this preparation is performed essentially as described in LKB techni-

cal note 250 using Servalyte 3-5 ampholines (Serva) in a polyacrylamide gel containing 5M urea.

In a second preparation, approximately 26 mg of recombinant erythropoietin in 6.5 ml of deionized water are applied to the gel and focused at 2.5 watts for 35 minutes and 10 watts for approximately 17 hours. The bands of focused protein, which are visible in the gel bed, are removed as 11 different pools. Each pool is brought to about 7.5 ml with deionized water and 20 ml of each of the resulting pool supernatants is subjected to analytical isoelectric focusing as described above. To each of the pools is added 5 ml of 1.5M Tris-HCl, pH 8.8 and the slurries are each placed in small columns and the liquid phase allowed to flow through. The resin is washed with approximately three volumes of 0.5M Tris-HCl, pH 7 and the rinse solution is combined with the flow through. The eluants are concentrated and buffer exchanged to 20 mM sodium citrate/100 mM sodium chloride, pH 7.0 using Amicon disposable ultrafiltration devices having a 10,000 dalton molecular weight cutoff. The concentrated solutions (approximately 0.5 ml) are then passed through a 0.22 micron cutoff cellulose acetate filter. Based upon analytical isoelectric focusing, five pools are found to contain predominantly the single isoforms 10, 11, 12, 13 and 14.

In a third preparation, approximately 30 mg of recombinant erythropoietin in 21.8 ml of distilled water is applied to the gel and focused at 2 watts for 25 minutes, 10 watts for 20 hours and 15 watts for 15 minutes. Protein bands corresponding to the individual isoforms are observed visually and removed from the gel bed. Distilled water is added to gel-isolated isoforms to generate a slurry and the resulting supernatants are analyzed by analytical isoelectric focusing. An equal volume of 1M Tris-HCl, pH 7.2 is added to each slurry, the suspensions are placed into separate small columns, and the liquid phase is allowed to flow through the column to elute the isoforms. Each flow through is concentrated and buffer exchanged to 20 mM sodium citrate/100 mM sodium chloride, pH 7.0 using Amicon disposable ultrafiltration devices having a 10,000 dalton molecular weight cutoff. An analytical isoelectric focusing gel revealed that pools containing predominantly the single isoforms 9, 10, 11, 12, 13 and 14 were obtained.

A fourth isoform preparation used as its starting material erythropoietin containing isoforms 3-9 (prepared as described above). Prior to preparative isoelectric focusing carried out essentially as described for preparations 1-3 above, the ampholytes (Pharmalyte 2.5-5) were prefractionated in a Rotofor (Bio-Rad, Richmond, Calif.) liquid phase isoelectric focusing cell to yield an ampholyte range more suitable for the lower isoelectric points of the starting material. The prefractionation was carried out by mixing 6.7 mL of Pharmalyte 2.5-5 with 15 g of urea and adding purified water to bring the volume to 50 mL. This mixture was fractionated in the Rotofor at 10 Watts, 1° C., for 5 1/2 hours using 0.1M phosphoric acid and 0.1M sodium hydroxide as the anolyte and catholyte, respectively. The ampholyte fractions having measured pHs of between 4.5 and approximately 6 were used in the flat-bed isoelectric focusing.

Ampholytes were removed from the isoforms using a Centriuluter (Amicon, Danvers, Mass.) and a 10,000 MW cutoff Centricon (Amicon) using the following parameters: 0.18 Tris buffer pH 8.8, 100 Volts, 25-30 mA, for 3 hours. The isoforms were then buffer exchanged into 0.1M sodium chloride by gel filtration using Sephadex G-25 (Pharmacia). Analytical isoelectric focusing of the five resulting pools showed them to contain isoforms 4,5,6,7, and 8. Isoform 4 ran as several bands, indicating that it may have undergone some degradation.

The fifth isoform preparation was modified by the addition of a pre-focusing step to the flat bed isoelectric focusing procedure. In this modification, the protein was not added to the ampholyte/urea/gel mixture prior to electrophoresis but was added to the isoelectric focusing apparatus following generation of the pH gradient in the gel bed. Following prefocusing for 75 minutes (1500 volt-hrs) the section of gel bed from 2.25–4.25 cm from the cathode was removed, mixed with the erythropoietin solution, and added back to the gel bed. Following isoelectric focusing, isoforms 10, 11, 12, 13, and 14 were eluted from the gel bed and separated from the ampholytes by ultrafiltration using Centricon-10 (Amicon) devices.

The pre-focusing modification was undertaken to make the ultraviolet absorbance characteristics of the isoform preparations more similar to that of the starting recombinant erythropoietin. This improvement in spectral characteristics can be seen in the ratio of absorbance at 280 and 260 nm for the isolated isoforms. The average ratio of absorbance at 280 nm to that at 260 nm (A_{280}/A_{260}) for isoforms from preparations 2 and 3 (non-prefocused) is 1.36 ± 0.11 while the average A_{280}/A_{260} ratio for preparations 5 and 6 (prefocused) is 1.68 ± 0.20 . When isoform #14 is excluded from the calculation, the average A_{280}/A_{260} ratios are 1.39 ± 0.11 and 1.74 ± 0.09 for preparations 2 & 3 and 5 & 6, respectively. (Isoform 14 may have the most atypical spectrum because it is present in the smallest amounts and is thus more subject to interferences by trace contamination by ampholyte components or because it is nearest to the electrode during the flat bed isoelectric focusing procedure). The average A_{280}/A_{260} ratio for recombinant erythropoietin prepared according to Example 2 of Lai et al. (modified as described earlier by using Q-Sepharose as the anion exchange resin) is 1.91 ± 0.04 .

As described above, the starting material for isoform preparation #6 was a recombinant erythropoietin preparation containing isoforms 4–13. The ampholytes were pre-focused in the Rotofor apparatus as per the fourth preparation. Ampholyte fractions having measured pHs of between 3.7 and 4.8 were used for the flat bed isoelectric focusing. The flat bed was pre-focused as in run #5 and isoforms 9, 10, 11, 12 and 13 were obtained after ultrafiltration (Centricon-10) to remove carrier ampholytes.

EXAMPLE 2

Sialic Acid Content of Recombinant Erythropoietin Isoforms

The isoforms isolated as described in Example 1 and erythropoietin purified according to procedures described in Lai et al., supra (mixture of isoforms 9 to 14) are buffer exchanged into 0.10–0.15M sodium chloride and analyzed for sialic acid content by a modification of the procedure of Jourdan et al. J. Biol. Chem. 246, 430 (1971). The sialic acid residues are cleaved from the glycoproteins by hydrolysis with 0.35M sulfuric acid at 80° C. for 30 minutes and the solutions are neutralized with sodium hydroxide prior to analysis. In order to estimate the amount of erythropoietin protein present, a Bradford protein assay (Bradford Anal. Biochem. 72, 248 (1976)) using recombinant erythropoietin having the amino acid sequence of human erythropoietin as standard is performed using the assay reagents and the micro-method procedure supplied by Bio-Rad. The results, expressed as moles of sialic acids per mole of erythropoietin, are shown in Table 1. Isoforms are designated according to the number of sialic acids per molecule and range from least acidic (Isoform 9) to most acidic (Isoform 13). Isoforms

9–13 are shown in gel lanes 6–10 of FIG. 1. Quantities of Isoform 14 are insufficient to accurately measure the sialic acid content. The sialic acid content of this isoform is inferred from its migration on IEF gels relative to other isoforms. The sialic acid content of isoforms 5–8 (preparation #4) has not been measured but is likewise inferred from their migration on IEF gels.

TABLE 1

ERYTHROPOIETIN ISOFORM	MOLES SIALIC ACID/ MOLE ERYTHROPOIETIN
Isoform 13	12.9 ± 0.5
Isoform 12	11.8 ± 0.2
Isoform 11	11.0 ± 0.2
Isoform 10	9.8 ± 0.3
Isoform 9	8.9 ± 0.6
Isoform Mixture (9-14)	11.3 ± 0.2

EXAMPLE 3

Activity of Recombinant Erythropoietin Isoforms

The isoforms isolated as described in Example 1 are assayed by absorbance at 280 nm, by Bradford protein assay and by RIA for erythropoietin to determine the amount of recombinant erythropoietin present. The exhypoxic polycythemic mouse bioassay (Cotes et al. Nature 191, 1065 (1961)) is used to determine the relative in vivo biological activity. Quantitation of the amount of erythropoietin protein present using a radioimmunoassay for erythropoietin produced results having higher relative in vivo specific activity for certain isoforms because of an apparent decreased immunoreactivity of isoforms containing large amounts of sialic acid leading to an underestimation of the erythropoietin concentration and thus an overestimation of the relative in vivo specific activity for the most negative isoforms. Mouse bioassay determinations, expressed as units/ml, are divided by the corresponding protein concentrations to give in vivo specific activities expressed as units/mg erythropoietin polypeptide. These specific activities are shown in Table 2.

In Table 2, "n" is the number of independent isoform preparations which contribute to the specific activity value. In most cases several in vivo assays were performed on each isoform preparation. The same in vivo data contribute to the specific activity calculations for all three columns, units/mg erythropoietin polypeptide was determined by the absorbance at 280 nm, from radioimmunoassay potencies, or from Bradford protein assay results. Purified recombinant erythropoietin containing isoforms 9–14 was used as the standard in the Bradford protein assay. "n" may be less for the calculation made using the Bradford protein assay as some preparations were no longer available at the time the Bradford assays were performed.

Erythropoietin purified according to the procedures described in Lai et al., supra and containing a mixture of isoforms 9 to 14 is used as a standard for the RIAs and in vivo assays.

The relative specific activities expressed as units/mg erythropoietin polypeptide can be converted to units/ A_{280} by multiplying by 0.807 mg erythropoietin polypeptide/ A_{280} . The conversion factor is derived by multiplying the extinction coefficient of erythropoietin ($1.345 \text{ mg}/A_{280}$) by the protein content of the erythropoietin glycoprotein (about 60% by weight, Davis et al. Biochemistry 26, 2633 (1987)) to obtain mg erythropoietin polypeptide/ A_{280} (i.e., $1.345 \text{ mg erythropoietin}/A_{280} \times 0.60 \text{ mg polypeptide/mg}$

erythropoietin=0.807 mg polypeptide/ A_{280}). In addition, specific activities expressed as units/mg erythropoietin polypeptide can be multiplied by the factor 0.60 mg polypeptide/mg erythropoietin glycoprotein to give specific activities expressed as units/mg erythropoietin glycoprotein.

TABLE 2

Isoform	U/mG Polypeptide (Bradford Protein Assay)	n	U/mG Polypeptide (From A280)	n	U/mG Polypeptide (From RIA)	n
14	289,400 $\pm$ 3,100	2	205,800 $\pm$ 37,700	2	366,700 $\pm$ 55,900	2
13	307,600 $\pm$ 30,600	4	258,700 $\pm$ 59,500	5	337,200 $\pm$ 40,200	5
12	275,200 $\pm$ 55,600	4	258,400 $\pm$ 41,700	5	287,700 $\pm$ 42,600	5
11	282,700 $\pm$ 41,100	3	255,800 $\pm$ 67,300	4	251,400 $\pm$ 62,700	4
10	188,000 $\pm$ 1,900	1	170,300 $\pm$ 34,500	3	171,900 $\pm$ 31,600	3
9	—	—	96,600 $\pm$ 46,700	2	113,600 $\pm$ 39,600	2
8	65,200 $\pm$ 3,800	1	70,600 $\pm$ 4,100	1	61,000 $\pm$ 3,500	1
7	46,200 $\pm$ 5,800	1	50,300 $\pm$ 6,300	1	42,800 $\pm$ 5,400	1
5	16,600 $\pm$ 1,700	1	18,300 $\pm$ 1,900	1	15,500 $\pm$ 1,600	1

The data in Table 2 are also presented graphically in FIGS. 2A, 2B and 2C. These data show that the relative in vivo activity of erythropoietin increases as a function of sialic acid content up until isoform #11. Isoforms 11–14 have essentially the same relative in vivo bioactivity. (This is most apparent when the concentration of isoform 14 is expressed using the Bradford assay value. The Bradford value may be more accurate for isoform 14 because of the generally low levels obtained and the resulting difficulty in determination by A_{280} and the most apparent decreased reactivity in the RIA of very negative forms discussed previously). The greater relative in vivo specific activity of erythropoietin isoforms having more sialic acid is most likely due to a longer circulating half-life of these forms. Isoforms 9 and 13 were labeled with radioactive iodine (^{125} I) and their rate of clearance in rats was determined. The half-life in circulation was significantly longer for isoform 13 than for isoform 9.

EXAMPLE 4

Selection of Recombinant Erythropoietin Isoform Mixtures by O-Sepharose Chromatography

Cell conditioned media from the production of recombinant erythropoietin according to the procedures described in *in. supra* are concentrated and diafiltered against 10 mM Tris, pH 7.2. Protein concentration is determined by the Bradford microprotein assay using bovine serum albumin as a standard. 19.6 ml of the solution containing 40 mg of total protein is made 20 μ M in CuSO_4 , filtered through a 0.45 micron cutoff filter and loaded onto a 4 ml bed volume (1.05 cm height $\times$ 2.2 cm diameter) column packed with Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia) which has been equilibrated with 10 mM Tris, pH 6.8 to 7.0 at 4° C. After sample application, the column is washed with two column volumes of the same buffer. The column flow rate is about 1 ml/min. Six separate columns are set up using this procedure to select defined erythropoietin isoform mixtures.

Columns are washed with 6 to 9 column volumes of a low pH buffer consisting of: Column #1, 150 mM acetic acid, 1 mM glycine, 20 μ M CuSO_4 , 6M urea adjusted to pH 4.7 with NaOH; Column #2, 200 mM acetic acid, 1 mM glycine, 20 μ M CuSO_4 , 6M urea adjusted to pH 4.7 with NaOH; Column #3, 250 mM acetic acid, 1 mM glycine, 20 μ M CuSO_4 , 6M urea adjusted to pH 4.7 with NaOH; Column #4, 300 mM acetic acid, 1 mM glycine, 20 μ M CuSO_4 , 6M urea

adjusted to pH 4.7 with NaOH; Column #5, 150 mM acetic acid, 1 mM glycine, 20 μ M CuSO_4 , 6M urea; Column #6, 300 mM acetic acid, 1 mM glycine, 20 μ M CuSO_4 , 6M urea. The pH of the columns is increased to approximately pH 7 by washing each one with 8 to 11 column volumes of 10 mM

Tris-HCl, 55 mM NaCl, 20 μ M CuSO_4 , pH 7. The defined erythropoietin isoform mixtures are eluted from the columns by washing with 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 20 μ M CuSO_4 , pH 7.0.

The eluted isoform pools from each column are concentrated and solvent exchanged into water using an Amicon Centricon-10 microconcentrator. The results of analytical isoelectric focusing of these concentrated pools are shown in FIG. 3. Gel lanes 1–6 represent defined erythropoietin isoform mixtures eluted from column 1–6, respectively. The "isoform mixture" shown in the far right gel lane of FIG. 3 represents cell media which is applied to a Q-Sepharose column as described above, the column is washed with 5 mM acetic acid, 1 mM glycine, 20 μ M CuSO_4 , 6M urea, and the erythropoietin isoform mixture is eluted from the column using the procedures described above. This eluted mixture of isoforms is further purified according to the procedures described in Lai et al., *supra* prior to analytical isoelectric focusing.

EXAMPLE 5

Fractionation of Recombinant Erythropoietin Isoforms Using a Low pH Gradient on O-Sepharose

In another procedure, erythropoietin isoforms are separated using a gradient of decreasing pH and increasing ionic strength. The concentrated diafiltered erythropoietin containing media is loaded to a column of Q-Sepharose at a ratio of approximately 40 mg total protein/mL gel. The column is then washed with approximately two column volumes of 10 mM Tris HCl, pH 7.0 and then approximately 10 column volumes of 2 mM acetic acid/1 mM glycine/20 μ M CuSO_4 /6M urea (pH approximately 4.8) to remove contaminating proteins and erythropoietin isoforms containing less than approximately 7 sialic acid residues. Isoforms containing from approximately 8 to approximately 12 sialic acids are eluted from the column using a gradient starting at approximately 2 mM acetic acid in 6M urea/1 mM glycine/20 μ M CuSO_4 and running to 40 mM acetic acid/6M urea/1 mM glycine/20 μ M CuSO_4 (pH approximately 4). The total volume of the gradient is approximately 40 column volumes and fractions of approximately one column volume each are collected into vessels containing a volume of Tris buffer sufficient to bring the pH into the range of 6–8.5 so as to avoid long term exposure of the collected fractions to low

pH. Aliquots of the fractions are subjected to analytical isoelectric focusing to monitor the separation. FIG. 4 shows the separation of isoforms 8-11 which may be achieved by this procedure. Isoforms 12-14 which remain bound to the column at the end of the gradient are eluted by washing with a buffer consisting of 10 mM TrisHCl, 140 mM NaCl, 20 μ M CuSO₄ (pH 7.0). The isoforms (separated during the gradient or eluted by the sodium chloride solution) are freed of contaminating proteins by reverse phase chromatography followed by gel filtration chromatography as described in Example 2 of Lai et al.

EXAMPLE 6

Analogues of Human Erythropoietin Having Additional Glycosylation Sites.

A. Construction of Human Erythropoietin Analogs.

The locations of existing and proposed carbohydrate attachment sites within the erythropoietin amino acid sequence are shown in FIG. 5 and the procedure for generating these additional glycosylation sites is summarized in FIGS. 6A-C and described below.

The following oligonucleotide primers were synthesized for use in in vitro mutagenesis:

[Asn⁴, Ser⁶] EPO: 5' CGCCCACCAAACCTC
AGCTGTGACAGCCGA 3'
[Asn⁹, Ser¹¹] EPO: 5' ATCTGTACAAACCGA
AGCCTGGAGAGGT 3'
[Asn⁶⁹] EPO: 5' GGGCCTGGCCAACCTGTGCGAAG 3'
[Asn¹²⁴] EPO: 5' TCCCCTCCAGAT
AAATGCCTCAGCTGC 3'
[Asn¹²⁵, Thr¹²⁷] EPO: 5' CAGATGCGAAACTCA
TCTGCTCCAC 3'
[Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵] EPO: 5' AGGCCTGCAGGAAATGGG
AGCAGATGACCAGGTG 3'
[Thr¹²⁵] EPO: 5' TCCAGATGCGACCCTCAGCTGCTC 3'
[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO: 5' CCTCCAGATCCG
ACCTCAGCTGC 3'

The underlined codons show the mismatched regions where the amino acids indicated in brackets replace the wild-type amino acids.

[Asn⁴, Ser⁶] EPO was constructed to add an N-glycosylation site at Asn 4. [Asn⁹, Ser¹¹] EPO was constructed to add an N-glycosylation site at Asn 9. [Asn⁶⁹] EPO was constructed to add an N-glycosylation site at Asn 69. [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO was constructed to add an N-glycosylation site at Asn 125. [Thr¹²⁵] EPO and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO were constructed to add an O-glycosylation site at Thr 125.

The following oligonucleotide primers are synthesized for use in in vitro mutagenesis:

[Asn⁶⁹, Thr⁷¹] EPO: 5' GGGCCTGGCCAACCTGAC
AGAAGCTGTC 3'
[Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹] EPO: 5' CAGGGCCTG
TCCAACCTGACAGAACTGTC 3'
[Asn¹²⁵, Thr¹²⁷] EPO: 5' CAGATGCGAAACTCAA
CGGCTCCAC 3'
[Asn¹²⁵, Thr¹²⁷, Thr¹³¹] EPO: 5'ATGCGAAACTCAA
CGGCTCCACTCACAACAATCACT 3'
[Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO: 5' CCAGATCCAAATCA
TCTGCTCCACTC 3'
[Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Thr¹²⁷] EPO: 5' CCAGATCCAAATCA
ACAGCTCCACTC 3'
[Thr¹²⁵, Thr¹²⁶] EPO: 5' CCAGATGCG
ACAACAGCTGCTCCA 3'
[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Thr¹³¹] EPO:

Starting from [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO cDNA, the oligonucleotide primer 5' AGATCCGACCAC

CGCTGCTCCAC 3' is used to generate [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶] EPO. The oligonucleotide primer 5'TGCTCCACTCACAACAATCACTG 3' is then used to generate [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Thr¹³¹] EPO.

[Asn⁶⁹, Thr⁷¹] EPO and [Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹] EPO are constructed to add an N-glycosylation site at Asn 69 and to enhance N-glycosylation at that site. [Asn¹²⁵, Thr¹²⁷] EPO, [Asn¹²⁵, Thr¹²⁷, Thr¹³¹] EPO, [Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO and [Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Thr¹²⁷] EPO are constructed to add an N-glycosylation site at Asn 125 and to increase glycosylation at that site. [Thr¹²⁵, Thr¹²⁶] EPO and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Ser¹³¹] EPO are constructed to add an O-glycosylation site at Thr 125 and to increase glycosylation at that site.

The source of erythropoietin DNA for in vitro mutagenesis was plasmid Hu13, a human erythropoietin cDNA clone in pUC 8 (Law et al. Proc Natl. Acad. Sci. 83, 6920 (1986)). Plasmid DNA derived from Hu13 was digested with BstEII and BglII restriction enzymes, the resulting DNA fragments were subjected to agarose gel electrophoresis, and the 810 base pair (bp) erythropoietin DNA fragment was isolated from the gel using a GeneClean™ kit and procedures supplied by the manufacturer (BIO 101, Inc.). Plasmid pBRgHuEPO contains the erythropoietin genomic gene as a BamHI fragment inserted into a derivative of pBR322, as described in commonly owned Lin patent, supra. pBRgHuEPO was also digested with BstEII and BglII and the 6517 bp vector fragment was recovered. Ligation of the two fragments results in IGT1. To construct pEC-1, pDSVL (described in commonly owned Lin patent, supra, and shown in FIG. 5B) was digested with BamHI and the isolated 2.8 kilobase (kb) BamHI fragment from IGT1 containing erythropoietin cDNA was ligated into it.

In order to generate single-stranded DNA for in vitro mutagenesis, pEC-1 was digested with BamHI and BglII and the 820 bp erythropoietin cDNA fragment was isolated. It was ligated into the BamHI site of m13mp18 to give m13-EC-1. Single stranded DNA was recovered from supernatants of *E. coli* strain RZ1032 infected by m13-EC-1 as described by Kunkel et al. Methods in Enzymol. 154, 367 (1987) and Messing, Methods in Enzymol. 101, 20 (1983). For in vitro mutagenesis approximately 1 μ g of single-stranded DNA and 0.2 pmole of one of the synthetic primers described above were mixed with 6 ml of buffer (250 mM Tris pH 7.8, 50 mM MgCl₂, and 50 mM dithiothreitol). For annealing of the primer to the template, the reaction volume was adjusted to 10 μ l with water, the mixture was heated to 65° C. for 5 minutes and then allowed to cool to room temperature. For the elongation reaction 2.5 ml of each of dTTP, dATP, dGTP, dCTP and ATP (all at 10 μ M) were added, followed by 1 μ l (1 unit) of *E. coli* DNA polymerase (Klenow fragment) and 1 μ l (1 unit) of T4 DNA ligase. The mixture was then incubated overnight at 14° C. and used to transform *E. coli* JM 109 (Yanisch-Perron et al. Gene 33, 103 (1985)) as described (Messing, supra).

To identify mutant clones by differential hybridization, plaques on nutrient agar were transferred to Gene Screen filters (New England Nuclear). The filters were dried under a heat lamp and then incubated for one hour in 6 $\times$ SSC containing 1% SDS at 60° C. For the hybridization, the oligonucleotide primer above (8 pmoles) was end-labeled with T4 polynucleotide kinase and γ 32p-labeled ATP and incubated with the filters overnight in 6 $\times$ SSC, 0.5% SDS and 100 mg/ml salmon sperm DNA at 37° C. for the [Asn¹²⁴] mutation, 55° C. for the [Asn⁴, Ser⁶] mutation, 65° C. for the [Thr¹²⁵] and the [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] mutations, and 70° C. for the [Asn⁹, Ser¹¹] and [Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵] mutations.

The next day, the filters were washed three times with 6xSSC at room temperature and subjected to autoradiography. If necessary, the filters were then washed with 6xSSC at increasing temperatures until little or no hybridization was detected to plaques having the wild-type erythropoietin CDNA sequence. Clones that gave positive hybridization signals under these conditions were identified and retransfected into JM109 to isolate a pure clone. Dideoxy chain termination sequence analysis indicated that the mutations to asparagine, serine threonine and proline residues were present.

Double stranded m13 EC-1 DNAs carrying the [Asn⁴, Ser⁶], [Asn⁹, Ser¹¹], [Asn¹²⁴], [Asn¹²⁵], [Ser¹²⁷], [Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵][Thr¹²⁵], and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] changes were recovered from JM109 transfected cells by the boiling method (Holmes et al. Anal. Biochem 117, 193 (1981)). The DNAs were digested with BstEII and XhoII and the 810 bp erythropoietin DNA fragments were isolated. pEC-1 were digested with BstEII followed by a partial digestion with BglII and the 5' termini of the resulting fragments are dephosphorylated with bacterial alkaline phosphatase in 10 mM Tris, pH 8 at 60° C. for 60 minutes. The 7 kb vector fragment lacking the 810 bp BstEII-BglII fragment was isolated and ligated to the erythropoietin fragments above. The resulting plasmids (designated pEC-X where X identifies the particular mutation) contain human erythropoietin with altered amino acid residues at the indicated positions.

cDNA clones of the human erythropoietin sequence and analogs corresponding to [Asn⁴, Ser⁶], [Asn⁹, Ser¹¹], [Asn¹⁶³], [Asn¹²⁴], [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷], [Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵], [Thr¹²⁵] and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] erythropoietin cDNA clones were transferred into COS-1 cells (ATCC No. CRL-1650) by electroporation. COS-1 cells were harvested from semi-confluent dishes, washed with medium (Dulbecco's modified essential medium containing 5% fetal calf serum and 1% L-glutamine/penicillin/streptomycin (Irvine Scientific)) and resuspended at 4x10⁶ cells/ml. One ml of cells was transferred to an electroporation cuvette (Bio-Rad) and electroporated with a Bio-Rad Gene Pulser™ at 25 μFarads and 1600 volts in the presence of 100 to 200 μg of carrier DNA and 2 to 20 μg of plasmid DNA encoding the erythropoietin analog. The electroporated cells were plated at 2x10⁶ cells per 60 mm tissue culture dish in 5 ml of medium. Two to four hours after plating the medium was replaced with 5 ml of fresh medium. The conditioned medium was collected 3 to 5 days after electroporation.

B. Assays for erythropoietin analog activity

RIAs were performed according to Egrie et al., supra. The in vivo biological activity of erythropoietin analogs was determined by the exhypoxic polycythemic mouse bioassay (Cotes et al., supra).

In vitro erythropoietin activity was determined by the erythroid colony forming assay as described by Iscove et al. J. Cell Physiol. 83, 309-320 (1974) with modifications. The mononucleated cells from human bone marrow cells were partially purified on a ficoll-paque cushion and washed in Iscove medium before plating to remove the adherent cells. The culture medium contained 0.9% methyl cellulose and did not include any bovine serum albumin. The erythroid colonies are scored after 8 to 10 days of culture.

The erythropoietin analogs transfected and expressed in COS cells as described in Section A were analyzed in crude COS cell supernatants by RIA and by the erythroid colony

forming assay. Human sequence erythropoietin has an in vitro activity that is comparable to the RIA activity as determined by the above-mentioned assays. The analogs [Asn⁶⁹] EPO, [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO, [Thr¹²⁵] EPO and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO exhibited an in vitro activity that is comparable to the RIA activity and gave evidence of having additional carbohydrate chains (as determined in Section C). These analogs are analyzed further by transfecting a cDNA clone encoding the erythropoietin analog into CHO cells, purifying the erythropoietin analog and measuring the in vivo biological activity of the purified analog.

C. Western Blot Analysis

A volume of supernatant containing 5-20 units from COS cells transfected with erythropoietin analog cDNAs as described in Section A was immunoprecipitated overnight at room temperature with a rabbit anti-erythropoietin polyclonal antibody. 20-80 μl of 1:1 Protein A-Sepharose in phosphate buffered saline (PBS) was added to the immunoprecipitate and allowed to incubate for one hour at room temperature. The samples were centrifuged, washed with PBS and, where indicated, the pellet was treated with N-glycanase to remove N-linked carbohydrate chains. The samples were analyzed by 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose and subjected to Western analysis as described (Burnette et al. Anal. Biochem. 112, 195-203 (1981); Elliot et al. Gene 79, 167-180 (1989)) using a mixture of mouse anti-erythropoietin monoclonal antibodies. One such antibody, 9G8A, is described in Elliot et al. (1989) Blood 74, Supp. 1, A. 1228.

Analysis of COS cell supernatants transfected with [Asn⁶⁹] EPO and [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO cDNA revealed increased protein size compared to human sequence erythropoietin. This increased size is indicative of an additional N-linked carbohydrate chain (FIG. 7). Treatment of supernatants from COS cells transfected with [Thr¹²⁵] EPO and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO cDNA with N-glycanase revealed an increased protein size compared to human sequence erythropoietin. This increased size is indicative of an additional O-linked carbohydrate chain (FIG. 8).

D. Isolation of Erythropoietin Analog Isoforms

The erythropoietin analog [Thr¹²⁵] EPO was constructed as described in Section A. An 810 bp. erythropoietin cDNA fragment carrying the [Thr¹²⁵] mutation was isolated by cleaving the plasmid pEC containing the [Thr¹²⁵] mutation with BstEII and BglII and ligating the fragment to pDECA, a derivative of pDSα2. pDSα2 is generally described in commonly owned U.S. patent application Ser. No. 501,904, now abandoned, hereby incorporated by reference. pDECA was derived from pDSα2 by the following steps:

- (1) The HindIII site of pDSα2 was deleted by digesting pDSα2 DNA with HindIII, treating the HindIII cohesive ends with *E. coli* DNA Polymerase (Klenow fragment) and dNTPs, and religating the blunt-ended vector. The resulting plasmid was pDSα2ΔH.
- (2) pDSα2ΔH was digested with SalI and a synthetic oligonucleotide having an SV40 splice signal with a SalI linker attached to the 3' end of the splice signal was ligated to it. The synthetic oligonucleotide had the following sequence:

5' TCGAGGAAGTGA AAAAACCAGAAAGT-TAACTGGTAAGTTTAGT CTTTTGTCTTT-

TATTTCAAGTCCCGGATCCGGTGGTGGT-
 G C A A A T C A
 AAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGC-
 CTTTACTTCTAGGCCTGTACGG AAGTGT-
 TACTTCTGCTCTAAAAGCTGCTGCAA-
 CAAGCTGGTCGACC 3'

The resulting plasmid was pDS α 2AH splice.

3) pDS α 2AH splice was digested with Sall and blunt-ended by treating the cohesive ends with T4 DNA polymerase and dNTPs. An 820 bp. BamHI-BglII human erythropoietin cDNA fragment was blunt-ended by the same method and ligated to the plasmid. The resulting plasmid was pDEC.

4) pDEC was digested with KpnI and PvuII and blunt-ended by treating the cohesive ends with mung bean nuclease. The plasmid was religated to delete the excised KpnI-PvuII fragment resulting in the plasmid pDECA.

Plasmid pDECA containing [Thr¹²⁵] erythropoietin cDNA was transfected into DHFR-deficient CHO cells. 770 ml of CHO cell conditioned medium was concentrated using a 10,000 dalton molecular weight cutoff membrane and diafiltered against 10 mM Tris-HCl, pH 8.6 to a final volume of 34 ml. A 17 ml. aliquot of the concentrate was loaded onto a Q-Sepharose fast flow column (5 ml bed volume) equilibrated in the same buffer and eluted in a linear gradient of 0-250 mM NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 8.6. Aliquots of column fractions, either untreated or digested with N-glycanase, were analyzed by SDS-PAGE or IEF and pools (designated 2, 3 and 4) were made based upon the isoform and/or carbohydrate composition of the fractions. Each pool was loaded onto a Vydac C4 column (214TPB 2030; 1 cm diameter; 1.8-2.5 ml bed volume; 0.34 ml/min) and washed with two column volumes of 20% ethanol in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0. The columns were eluted with linear gradients of 20-94% ethanol, 10 mM Tris, pH 7.0. Pools were made, diluted into 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, and loaded onto Q-Sepharose fast flow columns. Following a wash in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, the samples were eluted with 20 mM sodium citrate, 250 mM NaCl, pH 7.0. The purified [Thr¹²⁵] pools were analyzed by IEF and are shown in FIG. 9. EPO analog is analyzed for in vivo biological activity as described above (Cotes et al., supra).

While the invention has been described in what is considered to be its preferred embodiments, it is not to be limited to the disclosed embodiments, but on the contrary, is intended to cover various modifications and equivalents included within the spirit and scope of the appended claims, which scope is to be accorded the broadest interpretation so as to encompass all such modifications and equivalents.

What is claimed is:

1. An isolated biologically active erythropoietin isoform having a single isoelectric point and having a specific number of sialic acids per molecule, said number selected from the group consisting of 1-14, and said isoform being the product of the expression of an exogenous DNA sequence in a non-human eucaryotic host cell.

2. An erythropoietin isoform according to claim 1 wherein said isoform comprises erythropoietin having the amino acid sequence of 1-165 or 1-166 human erythropoietin.

3. An erythropoietin isoform according to claim 1 having 14 sialic acids per erythropoietin molecule.

4. An erythropoietin isoform according to claim 1 having 13 sialic acids per erythropoietin molecule.

5. An erythropoietin isoform according to claim 1 having 10 sialic acids per erythropoietin molecule.

6. An erythropoietin isoform according to claim 1 wherein said eucaryotic host cell is a CHO cell.

7. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of said erythropoietin isoform of claim 1 and a pharmaceutically acceptable diluent, adjuvant or carrier.

8. A composition consisting essentially of two or three erythropoietin isoforms according to claim 1.

9. A composition according to claim 8 wherein said isoforms have from 1 to 12 sialic acids per erythropoietin molecule.

10. A composition according to claim 9 wherein said isoforms have 9, 10 and 11 sialic acids per erythropoietin molecule.

11. A composition according to claim 8 wherein said isoforms have greater than 11 sialic acids per erythropoietin molecule.

12. A composition according to claim 11 wherein said isoforms have from 13-14 sialic acids per erythropoietin molecule.

13. Erythropoietin consisting essentially of erythropoietin molecules having a single specific number of sialic acids per molecule, said number selected from the group consisting of 1-14, and said molecules being the product of the expression of an exogenous DNA sequence in a non-human eucaryotic host cell.

14. Erythropoietin according to claim 13 having 14 sialic acids per erythropoietin molecule.

15. Erythropoietin according to claim 13 having 13 sialic acids per erythropoietin molecule.

16. Erythropoietin according to claim 13 having 10 sialic acids per erythropoietin molecule.

17. Erythropoietin according to claim 13 wherein said erythropoietin has the amino acid sequence of human erythropoietin.

18. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of the erythropoietin according to claim 13 and a pharmaceutically acceptable diluent, adjuvant or carrier.

19. A composition consisting essentially of erythropoietin molecules according to claim 13 having two or three specific numbers of sialic acids per erythropoietin molecule.

20. A composition according to claim 19 wherein said molecules have from 1 to 12 sialic acids per erythropoietin molecule.

21. A composition according to claim 19 wherein said molecules have greater than 11 sialic acids per erythropoietin molecule.

22. A composition according to claim 21 wherein said molecules have 13 and 14 sialic acids per erythropoietin molecule.

23. A method of preparing an erythropoietin isoform according to claim 1 comprising the steps of:

subjecting a purified erythropoietin to preparative isoelectric focusing, and

eluting a single isoform.

24. A method of preparing erythropoietin molecules having a predetermined number of sialic acids per molecule said number selected from the group consisting of 1-14, comprising applying material containing erythropoietin to an ion exchange column and selectively eluting said molecules from the column.

25. A method of preparing erythropoietin molecules having a predetermined number of sialic acids per molecule said number selected from the group consisting of 1-14, comprising applying material containing erythropoietin to a chromatofocusing column and selectively eluting said molecules from the column.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado
LUIS FELIPE CASTILLO GISBONE
(Apoderado)

ASUNTO	Radicación	05-8131	
	Trámite	002	
	Evento	001	
	Actuación	430	148
	Oficio	- -	
	Folios	04	

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (fase nacional)	☒	Cap. I	☐
		Cap. II	☒
No. Sol. Internacional		<u>PCT/US2003/020964</u>	
Fecha de Presentación Internal.		<u>01 de julio de 2003</u>	

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

<u>Descripción:</u>	Folios: 11 a 133	como se radicó inicialmente
<u>Reivindicaciones:</u>	Folios: 134 a 141 Folios: 317 a 334	como se radicó inicialmente como se modificó el 08/07/08.
<u>Figuras:</u>	Folios: 143 a 263	como se radicó inicialmente
<u>Prioridad:</u>	Folio: 2 Fecha: 01/07/2002 País: US Número 60/392,455	
<u>Rta. del solicitante:</u>	Folios: 293 a 305	como se radicó el 08/07/08

2. Objeto de la invención

- Título de la solicitud (folio 1): "Citoquinas recombinantes protectoras de tejido y ácidos nucleicos codificadores de las mismas para protección, restauración y mejoramiento de células, tejidos y órganos de respuesta".
- La presente solicitud se refiere a citoquinas recombinantes de luteína protectoras de tejido, que tienen una o más sustituciones de aminoácidos, composiciones farmacéuticas que las contienen. .
- El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de citoquinas modificadas, específicamente eritropoyetina para protección y mantenimiento celular y tisular.
- Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona métodos y composiciones para proteger o mejorar una célula, tejido, órgano o aumentar la viabilidad o funcionalidad de una parte corporal in vivo, in situ o ex vivo en mamíferos, mediante la administración sistémica o local de un modulador de actividad receptora de EPO, tal como una citoquina recombinante de tejido.
- La Clasificación Internacional de Patentes (IPC) es: G01N 33/53.

3. De la solicitud de Patente

Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio de la solicitud en estudio presenta los siguientes defectos:

- El capítulo reivindicatorio en general carece de sustento por cuanto no se identifican las composiciones que tienen efecto terapéutico y se extralimita a caracterizar una molécula sobre la base de resultados hipotéticos a partir de mutaciones de una molécula conocida y obtenida naturalmente como lo es la eritropoyetina. Aparte, la reivindicación principal así como repetidamente durante todo el capítulo reivindicatorio incurre en falta de claridad por cuanto se caracteriza la composición por resultados a alcanzar como el que la molécula "carece o tiene disminuida la actividad eritropoyética" y "tiene actividad protectora tisular según se determina in Vitro por examen P19". A lo largo de todo el capítulo reivindicatorio se caracteriza la composición por el resultado a alcanzar (p.e. reiv 7, 8, 42, 53,.. etc.) definiciones que no permiten determinar las características técnicas esenciales de la composición. Para que una composición esté correctamente caracterizada debe estar definida su secuencia y/o número de depósito, tener sustento en la descripción de su actividad, y si se realizan generalizaciones, estas deberán ser razonables dependiendo de los resultados encontrados.
- Las reivindicaciones posteriores (p.e. reiv. 2, 3, etc.) ofrecen una cantidad de posibles mutantes de eritropoyetina que no presentan sustento en la descripción y no permiten que un técnico versado en la materia obtenga los mismos resultados que el solicitante o cualquier otro técnico que intente llevar a cabo los desarrollos de la invención. La cantidad de posibles mutantes es tan amplia que excede lo desarrollado por el solicitante, y no permite establecer las características que comparte la molécula.

482
484

- Otras reivindicaciones implican el uso de las composiciones por ejemplo para transportar una molécula a través de una barrera de células, como lo indica la reivindicación 53 o 54. Otras reivindicaciones (p.e. 97) implican usos y métodos de tratamiento (reiv. 51) y formas de administración (reiv. 40) que no se consideran patentables por este despacho.
- Aunque el capítulo reivindicatorio modificado es menos general en la materia que el presentado inicialmente (por lo que se considera que no existe ampliación), se ha restado concisión y claridad por el alto numero de reivindicaciones presentadas que no permiten evidenciar los compuestos que son efectivamente la materia inventiva.

Por lo anterior, el capítulo reivindicatorio NO cumple con el requisito de definición, claridad, concisión o sustento por la descripción de acuerdo al art. 30 de la Decisión 486.y/o art.22 Tratado PCT.

4. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria: 5 de Agosto de 2003

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación*
D1	US 5.856.298	Erythropoietin isoforms	05/01/1999

5. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

5.1. Novedad (artículo 16 D486) y Nivel inventivo (artículo 18 D. 486)

- La solicitud en estudio divulga una composición farmacéutica que comprende una luteína de eritropoyetina recombinante de la SEQ ID No: 10 con uno o más residuos alterados de aminoácidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

D1 enseña (ver folios: 473 - 479) una serie de compuestos alterados de eritropoyetina (SEQ ID No: 10) ya sea químicamente o genéticamente presentando la misma secuencia (Fig 5 de D1) y la misma forma de obtener los compuestos reivindicados.

Los elementos característicos de las composiciones reivindicadas, ya eran conocidos en D1, la forma de realizar los mutantes, y las alteraciones en la molécula, así como los sitios de glicosilación y compuestos de unión como el ácido siálico para la obtención de moléculas dirigidos hacia los mismos objetivos terapéuticos de la solicitud. Por tal razón, los compuestos reivindicados no pueden ser considerados novedosos.

En vista de las objeciones realizadas al capítulo reivindicatorio y pese a la falta de claridad de las reivindicaciones, se considera que los compuestos reivindicados no

son novedosos ya que comparten todas las características esenciales que antecedió el documento D1.

Por otra parte, las mutaciones en residuos de aminoácidos de la molécula que cambien la estructura haciendo que la molécula sea diferente en residuos producto de la mutación, sin efecto probatorio hacia un efecto sorprendente, no implican altura inventiva.

De esta forma se establece que las reivindicaciones 1 a 100 no cumplen con el requisito de Novedad y Nivel Inventivo.

6. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

N°	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US 5.942.489	1 – 100	Novedad Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


JESUS FERNEL GARCÍA GARCÍA
(Director de Nuevas Creaciones (E))

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha

08 ENE 2010

CONCEPTO TÉCNICO No. 4321	EXAMINADOR TÉCNICO Código No. 202089
-------------------------------------	--

/103



AVISO DE NOTIFICACION
CORREO CERTIFICADO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación : 5-8131- -10-0 Fecha: 2010-05-04 09:50:38
Trámite : 11 PATENTEIYII
Evento : 378 FASENACIONALI
Actuación : 432 COMUNICACTOADM
Destinatario : LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE Folios 1

Señor (a) (es)
LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE
CRA 13 # 37-43 P. 12
BOGOTA D.C.

Referencia RESOLUCION : 23997
Fecha : 30/04/2010
Expediente : 5-8131
Trámite : 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II
Evento : 378 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
Actuación : 432 COMUNICACION ACTO ADMINISTRATIVO

Comendidamente le solicito presentarse a este Despacho ubicado en la Carrera 13 No. 27 - 00 Piso Quinto (5), de la ciudad de Bogotá D.C., dentro del término de cinco (5) días hábiles contados a partir del envío de la presente citación, en horario de 8:00 a.m. a 4:30 p.m. jornada continua, con el fin de notificarle personalmente el contenido de la resolución de la referencia proferida dentro del expediente tramitado con el número de radicación citado en el asunto.

De no hacerse presente en el término indicado anteriormente, la providencia en mención se notificará por edicto, el cual se fijará por el término de diez (10) días en el Centro de Documentación e Información.

Para su comodidad el texto completo de la resolución se encontrará disponible en la página web de la Entidad desde el día hábil siguiente al de su notificación, la cual podrá ser consultada desde un computador con acceso a Internet, en la página www.sic.gov.co, con el número de resolución a través de la opción servicios en línea bases de datos - otros servicios - consulta actos administrativos.

En caso de que se haya notificado, haga caso omiso de este aviso.

Secretaría General
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Al contestar favor indique el número de
radicación consignado en el sticker

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26- 55 int. 2 Tel 5880070
Call Center 6513240 . Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia