

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 113**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07724908 .4**  
96 Fecha de presentación: **05.05.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2018428**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2009**

54 Título: **Proteína de fusión antiinflamatoria**

30 Prioridad:  
17.05.2006 DE 102006024113  
13.07.2006 DE 102006033394

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.04.2012**

73 Titular/es:  
**EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN  
UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
GEISSWEG 3  
72076 TÜBINGEN, DE**

72 Inventor/es:  
**GAWAZ, Meinrad y  
DAUB, Karin**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 379 113 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Proteína de fusión antiinflamatoria

La presente invención se refiere a una proteína de fusión con potencial terapéutico y diagnóstico contra enfermedades vasculares crónicas, tales como aterosclerosis, a una molécula de ácido nucleico que codifica para esta proteína de fusión, a una composición farmacéutica y de diagnóstico que presenta la proteína de fusión o molécula de ácido nucleico, a un uso de la proteína de fusión o de la molécula de ácido nucleico para la producción de una composición farmacéutica o de diagnóstico, a un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades vasculares agudas o crónicas, así como a un procedimiento para la producción de la proteína de fusión.

La aterosclerosis es un proceso patológico activo, altamente complejo en cuyo centro se encuentra una reacción inflamatoria en las paredes de los vasos sanguíneos de un individuo afectado. El origen de la aterosclerosis, la denominada aterogénesis, puede dividirse en varias fases.

La fase temprana de la aterogénesis se caracteriza por una denominada disfunción endotelial. Una serie de diferentes factores de riesgo, tales como por ejemplo fumar, sobrepeso, inactividad física, hiperlipoproteinemia y diabetes de tipo II así como otros factores no identificados hasta el momento, llevan a un deterioro del endotelio. Por ello aumenta la permeabilidad del endotelio para lipoproteínas y otras sustancias en circulación en el plasma. Como resultado se activan las células endoteliales y expresan más las denominadas moléculas de adhesión sobre la superficie celular. Entre ellas, sobre todo las denominadas selectinas median en primer lugar el contacto temporal de determinadas células sanguíneas tales como monocitos y linfocitos T con el endotelio. Mediante un grupo adicional de moléculas de adhesión, las denominadas *Cellular Adhesion Molecules* (CAM) (moléculas de adhesión celular), se produce la adherencia firme de estas células a la pared vascular. Especialmente en las ramificaciones vasculares, los sitios en los que se originan frecuentemente lesiones ateroscleróticas, participan además fuerzas mecánicas. Fuerzas de cizallamiento elevadas pueden reducir la formación de nitrógeno endotelial (NO). El NO actúa dilatando los vasos y tiene propiedades antiinflamatorias. Además, fuerzas de cizallamiento elevadas llevan a un aumento de formación de moléculas de adhesión con las consecuencias descritas anteriormente.

A continuación, sobre todo los monocitos y en menor medida los linfocitos T, penetran en el espacio subintimal. Esta penetración se media por otro grupo de moléculas, a las que pertenecen por ejemplo la quimiocina proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1). Se produce la diferenciación de los monocitos en macrófagos en el espacio subintimal.

En el endotelio deteriorado se produce además la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL) y de este modo la formación de oxLDL. La oxLDL se emite al espacio subintimal, en el que carga los macrófagos que se desprenden a partir de monocitos en el mismo. Estos macrófagos se transforman mediante la carga con oxLDL en las denominadas células espumosas, las células características de las placas ateroscleróticas que, como componentes adicionales contienen, entre otros, linfocitos T y células del músculo liso que inmigran desde los medios.

Una placa aterosclerótica de este tipo se deposita en las paredes arteriales y se recubre a este respecto por una tapa fibrosa estabilizadora compuesta por células del músculo liso y matriz extracelular. La placa aterosclerótica se encuentra ahora en el centro de una reacción inflamatoria, en la que se produce la producción de los más diversos mediadores inflamatorios, tales como citocinas, quimiocinas, proteasas etc. A este respecto puede producirse necrosis tisular, depositándose en sus proximidades sales de calcio. De esta manera puede estrecharse la luz del vaso hasta el cierre completo con el resultado de trastornos circulatorios.

Si se produce una reducción de la formación de matriz extracelular por las células del músculo liso y su aumento de degradación por enzimas degradantes, se produce el adelgazamiento de la tapa fibrosa y se desestabiliza la placa aterosclerótica. La placa puede desgarrarse, dejando al descubierto el núcleo lipídico trombogénico y el colágeno en el vaso sanguíneo. La activación debida a esto del sistema de hemostasia lleva a la formación de trombos oclusivos y no oclusivos, es decir a la activación de la cascada de coagulación, en cuyo centro se encuentra el denominado *Tissue Factor* (TF) (factor tisular). Desde el punto de vista clínico, la ruptura de placa se manifiesta con la formación de trombos como angina de pecho inestable o infarto de miocardio agudo.

Actualmente la aterosclerosis se trata por regla general mediante la administración de agentes reductores de lípidos o estatinas. A este respecto se trata de un grupo de principios activos que inhiben finalmente la síntesis de colesterol endógeno. Entre las estatinas figuran, entre otras, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina (mevinolina), mevastatina (compactina), pravastatina y simvastatina. Estas sustancias influyen de distinta manera en el metabolismo lipídico, por ejemplo mediante la inhibición competitiva de la enzima clave de la síntesis de colesterol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A-reductasa, mediante la disminución de la síntesis de colesterol en el hígado, mediante el aumento de los receptores de LDL en las células del hígado y mediante la modificación de la composición de lipoproteína. Las estatinas tienen una gran influencia sobre la composición de los lípidos en el suero y llevan, entre otras cosas, a un ligero incremento de la concentración de las denominadas "*High Density Lipoproteins*" (HDL) (lipoproteínas de alta densidad) y a una gran reducción de la concentración de LDL. En conjunto, mediante la acción de las estatinas, circulan menos grasas en la sangre, de modo que las placas ateroscleróticas acumulan menos grasa y de este modo se reduce el riesgo de una trombosis y de los peligros que

resultan de la misma.

Aunque se atribuye a las estatinas aún una serie de propiedades positivas adicionales, éstas han sido objeto críticas debido a una acumulación sorprendente de efectos secundarios raros pero graves en los músculos y riñones en relación con la toma. Por este motivo se retiró del mercado especialmente el principio activo cerivastatina (por ejemplo Lipobay®, Zenas®) en Alemania en agosto de 2001.

El documento EP 1 046 652 describe una proteína de fusión que presenta un dominio extracelular de receptor LOX-1 bovino y un dominio Fc y que se usa en un ensayo para examinar la interacción de LDL oxidada y del receptor LOX-1.

En este contexto, es objetivo de la presente invención proporcionar una nueva sustancia que presente el potencial terapéutico y de diagnóstico en cuanto al tratamiento y el diagnóstico de enfermedades vasculares agudas o crónicas, tales como la aterosclerosis o placas arterioscleróticas, y con la que se eviten en su mayor parte o se reduzcan las desventajas mencionadas anteriormente de los agentes reductores de lípidos conocidos.

Este objetivo se alcanza mediante una proteína de fusión que presenta (a) un primer polipéptido que se une específicamente a LDL oxidada (oxLDL) así como (b) un segundo polipéptido que media una dimerización, presentando el primer polipéptido un segmento o una variante de secuencia de CD68, que presenta la función de unión a LDL de CD68.

Según la invención, por una proteína de fusión se entiende una proteína híbrida o una proteína artificial que puede producirse *in vitro* pero también *in vivo* mediante procedimientos de Biología Molecular conocidos en el estado de la técnica. Para ello se usan preferentemente vectores de expresión habituales que codifican para la proteína de fusión según la invención. Estos vectores de expresión se introducen en una célula adecuada que produce después la proteína de fusión.

El primer polipéptido está configurado a este respecto mediante la elección adecuada de la secuencia de aminoácidos de tal manera que éste adopte una estructura secundaria o terciaria, que se une de manera selectiva y con alta afinidad a lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL). Esto es fácil para un químico especializado en síntesis de proteínas, dado que en el estado de la técnica se conoce la estructura espacial de LDL. El segundo polipéptido se configura en cuanto a su secuencia de aminoácidos de tal manera que éste presente un segmento de una proteína que esté implicado en la mediación de una dimerización de dos proteínas o subunidades de proteína separadas. También esta medida es fácil para el experto, dado que en el estado de la técnica se describen con todo detalle las estructuras finas incluyendo las secuencias de aminoácidos de complejos diméricos peptídicos para una pluralidad de proteínas. Las proteínas que forman dímeros conocidas, de las que se conoce su secuencia y estructura comprenden proteínas G, histonas, interferón  $\gamma$ , receptor de interleucina 2, Hsp90, tirosina cinasas, moléculas de IgG etc. Los dominios de las proteínas mencionadas respectivos que median la dimerización pueden adoptarse directamente para la producción de la proteína de fusión según la invención. No obstante puede desearse de todos modos modificar estos dominios mediante mutagénesis dirigida o también mediante inserción C y/o N terminal de aminoácidos individuales, de modo que, por ejemplo, se reduzca la acción inmunológica de la proteína de fusión, se posibilite la mejor producción de la proteína de fusión, manteniéndose sin embargo en su mayor parte la función de dimerización.

Con ello se alcanza completamente el objetivo en el que se basa la invención. De este modo los inventores han descubierto precisamente que una proteína de fusión según la invención se enriquece tras la aplicación en un ser vivo preferentemente de forma exclusiva en áreas vasculares previamente dañadas o modificadas por aterosclerosis, de modo que pueden evitarse en su mayor parte posibles efectos secundarios sistémicos no específicos. La proteína de fusión según la invención atrapa entonces, debido a la alta afinidad por LDL oxidada, que se media por el primer segmento de polipéptido, la LDL oxidada. Aunque también un monómero de la proteína de fusión puede atrapar LDL oxidadas, de este modo se aumenta mucho más la afinidad hacia LDL oxidada mediante la dimerización de dos proteínas de fusión según la invención, que se media por el segundo segmento de polipéptido.

Mediante la complejación de la LDL oxidada ésta se inactiva y con ello se impide o se reduce en su mayor parte la carga de macrófagos y la posterior transformación de estas células en células espumosas. De esta manera se interviene ya en la fase temprana de la aterogénesis. La formación de placas arterioscleróticas y las consecuencias fatales mencionadas anteriormente sobre el organismo se inhiben claramente y dado el caso incluso se impiden. A este respecto se representa como ventaja especial adicional que el complejo de proteína de fusión y LDL oxidada debido a su origen completamente humano es poco inmunogénico y en el caso de la "eliminación de desechos" las posibles reacciones inflamatorias transcurren de forma extraordinariamente débil o no se producen en absoluto.

El primer polipéptido está diseñado de tal manera que éste se une a una LDL oxidada (oxLDL).

Esta medida tiene la ventaja de que se proporciona una proteína de fusión tal que se une y atrapa precisamente la variante de LDL, que desempeña un papel decisivo para la transformación de macrófagos en células espumosas. Mediante este perfeccionamiento según la invención se debilita o incluso se elimina por lo tanto de manera controlada en su función, con oxLDL, un factor clave de la aterogénesis.

El primer polipéptido presenta un segmento o una variante de secuencia que presenta la función de unión a LDL de CD68.

5 Según un perfeccionamiento según la invención, el primer polipéptido presenta el receptor-eliminador CD68, preferentemente el dominio extracelular de CD68 o incluso un fragmento o una variante del dominio extracelular de CD68 tal que presenta la función de unión a LDL de CD68.

10 Esta medida tiene la ventaja de que como primer polipéptido se proporciona uno tal que presenta una afinidad especialmente alta y selectiva hacia oxLDL. CD68, que se denomina también como macrosialina o gp110, representa una glicoproteína transmembrana, que se expresa de forma reforzada en monocitos y macrófagos tisulares. Tanto la secuencia de aminoácidos como la secuencia de nucleótidos codificante se dan a conocer en el estado de la técnica; véase el N° de registro del banco de datos NCBI AAB25811 o NP\_001242 (secuencia de aminoácidos de la variante humana), N° de registro del banco de datos NM\_001251 o AAH15557 (secuencia de nucleótidos del ARNm de la variante humana). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos identificadas anteriormente son mediante referencia en el presente documento, componente de la presente invención.

15 La variante humana de CD68 se refiere a una proteína grande de 110 kD que está compuesta por 354 aminoácidos. CD68 se cuenta entre los denominados receptores-eliminadores, dado que a través de su dominio extracelular puede unirse a la LDL oxidada. CD68 se expresa de manera natural sobre la superficie de monocitos, macrófagos, neutrófilos y basófilos así como grandes linfocitos.

A este respecto se prefiere además si el primer polipéptido no presenta toda la secuencia de aminoácidos de CD68 sino más bien el dominio extracelular de CD68.

20 Esta medida tiene la ventaja especial de que para la función según la invención de la proteína de fusión se suprimen segmentos de péptido innecesarios. La proteína de fusión según la invención se reduce en su tamaño, sin que corresponda de esta manera a las posiciones 66 a 960. Se entiende que no es posible de manera precisa una delimitación según la naturaleza a un resto de aminoácido o un nucleótido.

25 Para cumplir la función según la invención la proteína de fusión no debe presentar obligatoriamente la secuencia de aminoácidos completa o idéntica de CD68 o el dominio extracelular de CD68. Más bien, la función según la invención de la proteína de fusión se cumple también si el primer polipéptido presenta un segmento o una variante de secuencia de CD68 o el dominio extracelular de CD68, que sin embargo ejerce aún la función de unión a LDL de CD68 de forma dado el caso debilitada. De manera conocida los aminoácidos proteínogénicos se dividen en cuatro grupos, concretamente en aminoácidos polares, no polares, ácidos y básicos. El intercambio de un aminoácido polar por otro aminoácido polar, por ejemplo glicina por serina, lleva por regla general a ninguna modificación o sólo una modificación insignificante de la actividad biológica de la proteína correspondiente, de modo que un intercambio de aminoácidos de este tipo deja intacta en su mayor parte en su función la proteína de fusión según la invención. En este contexto, la presente invención incluye también una proteína de fusión tal que como primer polipéptido presenta una variante de CD68 o su dominio extracelular, en el que se intercambia uno o varios aminoácidos de una de las clases de aminoácidos mencionada por otro aminoácido de la misma clase. A este respecto, una variante de secuencia de este tipo es homóloga preferentemente en aproximadamente el 70 %, más preferentemente en aproximadamente el 80 % y de manera sumamente preferentemente en aproximadamente del 90 al 95 % a la secuencia de aminoácidos de CD68 o del dominio extracelular de CD68.

40 A este respecto se prefiere si el segundo polipéptido presenta un dominio Fc de una inmunoglobulina, o presenta incluso un fragmento o una variante del dominio Fc que presenta la función de dimerización del dominio Fc. Con esta medida se garantiza de manera ventajosa que la proteína de fusión presenta únicamente los segmentos de péptido que son suficientes para la dimerización de dos monómeros de la proteína de fusión según la invención. "Fc" representa a este respecto "*fragment crystallizable*" (fragmento cristalizabile). Este fragmento se genera mediante la escisión de papaína de la molécula de IgG junto a los dos fragmentos Fab. El dominio Fc está compuesto por los dominios CH2 y CH3 emparejados incluyendo la región bisagra (en inglés "*hinge region*") y contiene la parte de la inmunoglobulina que es responsable de la función de dimerización. Se entiende que también puede usarse un fragmento o una variante del dominio Fc, sin que se perjudique la función según la invención de la proteína de fusión, siempre que el fragmento o la variante presente aún la función de dimerización dado el caso debilitada de un anticuerpo; véanse las realizaciones anteriores para el fragmento o la variante de CD68, que sirven igualmente para el fragmento o la variante de Fc.

Según un perfeccionamiento preferido, la variante del dominio Fc presenta una mutación en la región de unión a receptor de Fc y al complemento tal que reduce la inmunogenicidad de la proteína de fusión según la invención.

55 Esta medida tiene la ventaja de que se eleva adicionalmente la tolerabilidad de la proteína de fusión según la invención. De este modo, según los conocimientos de los inventores, es suficiente para la función según la invención de la proteína de fusión, concretamente si el segundo polipéptido presenta únicamente la función de dimerización del dominio Fc del anticuerpo, pero no las funciones de efector que provocan una activación del sistema inmunitario. Por lo tanto puede usarse por ejemplo también un fragmento Fc sintético, que está mutado en la región de unión al receptor de Fc y al complemento de tal manera que se reduce en su mayor parte una activación del sistema

inmunitario y dado el caso incluso no existe.

Asimismo se prefiere si la proteína de fusión presenta un elemento que conecta el primer polipéptido con el segundo polipéptido.

5 Esta medida tiene la ventaja de que se crean condiciones previas constructivas para posibilitar la producción de la proteína de fusión según la invención por medio de los más diversos vectores de expresión. En el caso del elemento que va a unirse puede tratarse de una sucesión de aminoácidos con cualquier composición, que presenta preferentemente de uno a 100 aminoácidos. En el caso de un elemento que va a unirse de este tipo puede tratarse también de aminoácidos que se generan durante la producción de la proteína de fusión según la invención mediante ligación de los dos polipéptidos.

10 Según una variante preferida el primer polipéptido de la proteína de fusión según la invención presenta la secuencia de aminoácidos SEQ. ID No. 1 del protocolo de secuencias adjunto.

Con esta medida se proporciona de manera ventajosa un polipéptido que se une a LDL modificada u oxLDL. La secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1 se deriva de la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la proteína CD68 humana.

15 Según un perfeccionamiento preferido la proteína de fusión presenta un primer polipéptido que se codifica por una molécula de ácido nucleico que presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 2 ó 3 del protocolo adjunto.

20 Esta medida tiene la ventaja de que se proporciona ya una secuencia codificante que codifica para el dominio extracelular de la proteína CD68 humana y puede producirse fácilmente tras la introducción en un vector de expresión a través de bacterias por medio de procedimientos conocidos en el estado de la técnica. La secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 2 se deriva de la secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio extracelular de la variante humana de la proteína CD68. La secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 3 considera uno de los polimorfismos presentes en la población en el dominio extracelular de la proteína CD68 humana, en el que se intercambia un triplete de bases cag por un triplete de bases aag. No se conoce un significado funcional del polimorfismo.

25 Se entiende que no sólo la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 2 ó 3 es adecuada para la producción del dominio extracelular de la proteína CD68, sino también variantes de la misma que debido a la degeneración del código genético codifican para el mismo polipéptido. De este modo se conoce que el código genético está degenerado, dado que el número de codones posibles es mayor que el número de los aminoácidos. Para la mayoría de los aminoácidos existe más de un codón, de modo que por ejemplo arginina, leucina y serina se codifican por hasta seis  
30 codones. Por regla general la tercera posición de codón está limitada o puede intercambiarse por completo. En este contexto se proporciona también una proteína de fusión tal, en la que el primer polipéptido se codifica por una molécula de ácido nucleico, que debido a la degeneración del código genético difiere con respecto a la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 2 ó 3 en posiciones de nucleótidos individuales, sin embargo codifica de la misma manera para el dominio extracelular de la proteína CD68. Preferentemente una variante de este tipo presenta con respecto a  
35 la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 2 ó 3 una homología de aproximadamente el 70 %, más preferentemente una homología de aproximadamente el 80 % y de manera sumamente preferente una homología de aproximadamente el 90 al 95 %.

A este respecto se prefiere adicionalmente si el segundo polipéptido presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 4 del protocolo de secuencias adjunto.

40 Con esta medida se proporciona de manera ventajosa ya un segundo polipéptido que media la dimerización, que se deriva del fragmento Fc de la variante de IgG1 humana y, para la reducción de la inmunogenicidad presenta una mutación en la región de unión al receptor de Fc y al complemento. Mediante mutagénesis dirigida se intercambió para ello en la posición 331 una prolina por una serina y en las posiciones de aminoácido 234 a 237 el tetrapéptido Leu-Leu-Gly-Gly por Ala-Ala-Ala-Ala. Para facilitar la expresión del péptido se optimizó con codón este polipéptido  
45 además con respecto a la secuencia natural del fragmento Fc de IgG1 humana para células CHO.

Según un perfeccionamiento según la invención, el segundo polipéptido se codifica por una molécula de ácido nucleico que presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 5 del protocolo de secuencias adjunto.

50 Esta medida tiene la ventaja de que ya se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica para el segundo polipéptido descrito anteriormente, que se deriva del dominio Fc de la molécula de IgG1 humana. Tras la introducción de la secuencia codificante en un vector de expresión se transforman células adecuadas, por ejemplo células CHO, por medio de procedimientos conocidos en el estado de la técnica, que después producen el segundo polipéptido deseado. Se entiende que no sólo la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 5 es adecuada para la producción del segundo polipéptido, sino también una variante de la misma. Más bien puede preverse también una molécula de ácido nucleico tal que debido a la degeneración del código genético difiera con respecto a la secuencia  
55 de nucleótidos SEQ ID No. 5 en posiciones de nucleótidos individuales, sin embargo codifica de la misma manera para el segundo polipéptido deseado. Preferentemente una variante de este tipo presenta con respecto a la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 5 una homología de aproximadamente el 70 %, más preferentemente una

homología de aproximadamente el 80 % y de manera sumamente preferente una homología del 90 al 95 %.

Se prefiere especialmente si la proteína de fusión según la invención presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 6 del protocolo de secuencias adjunto.

5 Con esta medida se proporciona ya una estructura primaria completa para una proteína de fusión preferida según la invención, de modo que ésta puede producirse de manera útil y sencilla o bien directamente por medio de síntesis de péptidos o bien también tras transcripción en la secuencia codificante a través de procedimientos de biología molecular. A este respecto la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 6 no presenta sólo en el extremo N-terminal el segmento para el dominio extracelular de CD68 y en el extremo C-terminal el segmento para el fragmento Fc, sino también un elemento intermedio que está compuesto por tres aminoácidos y conecta el dominio extracelular de CD68 y el fragmento Fc entre sí. Se entiende que dentro de la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 6 pueden intercambiarse aminoácidos individuales de una clase por aminoácidos de la misma clase, tal como se representa adicionalmente anteriormente, sin que se vea influida claramente la función según la invención de la proteína de fusión. Se entiende además que la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 6 puede presentar en su extremo N y/o C terminal otros aminoácidos, que sirven únicamente para la mejor expresión de la proteína de fusión y expulsión de la misma de las células de expresión o están presente únicamente en cuanto a la construcción. Los aminoácidos de este tipo pueden proceder por ejemplo de la cadena kappa de Ig humana o incluso de un sitio de clonación múltiple (MCS).

Se prefiere además si como proteína de fusión según la invención se proporciona una tal que se codifica por una molécula de ácido nucleico que presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 7 u 8 del protocolo de secuencias adjunto.

Esta medida tiene la ventaja de que se indica al experto ya una secuencia codificante que codifica para una variante de realización especialmente adecuada de la proteína de fusión según la invención. La secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 7 no presenta asimismo sólo secuencias codificantes que codifican para el dominio extracelular de CD68 y para el segundo polipéptido que se deriva del fragmento Fc, sino también un segmento intermedio que está compuesto por tres tripletes de bases, y codifica para el elemento de unión mencionado anteriormente. La secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 8 considera el polimorfismo mencionado anteriormente en el dominio de CD68 extracelular, de modo que con respecto a la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 7 se intercambia un triplete de bases cag por un triplete de bases aag. La molécula de ácido nucleico según la invención puede introducirse, por medio de procedimientos conocidos en el estado de la técnica, en un vector de expresión, con el que después se transforman células biológicas adecuadas, por ejemplo células CHO, que expresan la proteína de fusión deseada. Se entiende que en lugar de las secuencias de nucleótidos SEQ ID No. 7 u 8 pueden usarse también variantes de las mismas que, que debido a la degeneración del código genético, codifican para las mismas proteínas de fusión.

Según un perfeccionamiento preferido, la proteína de fusión según la invención presenta un marcador detectable.

Esta medida tiene la ventaja de que de esta manera la proteína de fusión en sitios de su enriquecimiento *in vitro* pero también *in vivo* por medio de procedimientos de formación de imágenes y por lo tanto es especialmente adecuada para la identificación de por ejemplo placas ateroscleróticas. Según la invención, por un marcador detectable se entiende un compuesto cualquiera que puede identificarse por medio de procedimientos de formación de imágenes. Entre ellos figuran indicadores de color, tales como colorantes con propiedades fluorescentes, fosforescentes o quimioluminiscentes, AMPPD, CSPD, indicadores radioactivos, tales como <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, indicadores no radioactivos, tales como biotina o digoxigenina, fosfatasa alcalina, peroxidada del rábano etc. Según la naturaleza del marcador, como procedimientos de formación de imágenes se tienen en cuenta la autorradiografía, técnicas de representación, de hibridación o de microscopía.

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un homodímero que presenta la proteína de fusión según la invención identificada anteriormente.

45 Los inventores han comprobado que la actividad de la proteína de fusión según la invención se aumenta considerablemente mediante la dimerización. A este respecto es ventajoso que, por ejemplo líneas celulares CHO, que se transforman con un vector de expresión que codifica para la proteína de fusión según la invención, secreten un dímero soluble, en el que se reticulan dos proteínas de fusión a través de puentes disulfuro en la región del segundo polipéptido, por ejemplo en la región del dominio Fc. A este respecto se comprueba que en el caso de un homodímero de este tipo en comparación con el monómero se eleva claramente la afinidad hacia LDL modificada, especialmente hacia oxLDL. Los inventores tienen indicios de que los homodímeros, tras la aplicación sistémica en un ser vivo se enriquecen rápidamente y de manera específica exclusivamente en zonas vasculares dañadas previamente o modificadas por aterosclerosis y pueden evitarse en su mayor parte una rápida degradación en la sangre así como posibles efectos secundarios sistémicos no específicos. Los inventores tienen también indicios de que el homodímero según la invención puede provocar adicionalmente una desactivación o un bloqueo del receptor de CD68 nativo en el ser vivo, evitándose la endocitosis de LDL mediante macrófagos y la transformación en células espumosas. Un mecanismo de este tipo se describe en el estado de la técnica ya para otros receptores-eliminadores solubles, tales como para SR-A1; véase Gough y col. (2001), The use of human CD68 transcriptional regulatory sequences to direct high-level expression of class A scavenger receptor in macrophages *in vitro* and *in vivo*,

Immunology 103, páginas 351 a 361. Los inventores pudieron detectar en ensayos de cocultivo *in vitro*, que mediante la adición de concentraciones crecientes del homodímero según la invención puede lograrse una inhibición significativa de la formación de células espumosas y pueden inhibirse las más diversas funciones de célula espumosa, tales como por ejemplo la liberación de MMP-9.

5 En este contexto, un objeto adicional según la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión según la invención identificada previamente. La molécula de ácido nucleico según la invención presenta preferentemente (a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que se une específicamente a LDL modificada, preferentemente a oxLDL, y (b) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que media una dimerización. La molécula de ácido nucleico según la invención  
10 presenta preferentemente la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 2 ó 3, No. 5 o No. 7 u 8 del protocolo de secuencias adjunto, o una variante respectiva de la misma, que debido a la degeneración del código genético codifica para el mismo polipéptido. Se entiende que la molécula de ácido nucleico puede presentar otros segmentos de nucleótidos que posibilitan o favorecen por ejemplo una expresión o producción en células transformadas de manera correspondiente. De este modo, por ejemplo en el extremo en 5' puede estar previsto un segmento líder de la cadena kappa de la molécula de IgG así como aminoácidos en cuanto a la construcción que se conectan al mismo del sitio de clonación múltiple (MCS), que sin embargo se disocian dado el caso en el producto de traducción del constructo total y por esto no aparecen forzosamente en la proteína de fusión según la invención.  
15

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica y/o de diagnóstico, que presenta la proteína de fusión según la invención y/o el homodímero según la invención y/o la molécula de ácido nucleico según la invención así como dado el caso un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico y/o de diagnóstico y dado el caso aditivos activos desde el punto de vista farmacéutico y/o de diagnóstico adicionales.  
20

Los vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico y de diagnóstico con aditivos adicionales dado el caso se conocen en general en el estado de la técnica y se describen por ejemplo en el tratado de Kibbe A., Handbook of Pharmaceutical Excipients, tercera edición, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press 2000. Los aditivos comprenden según la invención cualquier compuesto o composición que sea ventajosa para un uso terapéutico o de diagnóstico de la composición, entre las que se encuentran sales, aglutinantes y otras sustancias usadas en relación con la formulación de fármacos.  
25

Un objeto adicional de la presente invención se refiere al uso de la proteína de fusión según la invención y/o del homodímero según la invención y/o de la molécula de ácido de proteína según la invención para la producción de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico para el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades vasculares agudas o crónicas, incluyendo aterosclerosis, placas ateroscleróticas, infarto de miocardio, apoplejía y enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP).  
30

La invención se realiza además en un procedimiento para la producción de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico para el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades mencionadas anteriormente, que presenta las siguientes etapas: (a) proporcionar la proteína de fusión según la invención y/o el homodímero según la invención y/o la molécula de ácido nucleico según la invención; (b) formular en un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico y/o de diagnóstico, y dado el caso (c) añadir otros aditivos activos desde el punto de vista farmacéutico y/o de diagnóstico.  
35

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades vasculares agudas o crónicas, incluyendo aterosclerosis, placas ateroscleróticas, infarto de miocardio, apoplejía y EOAP, en un ser vivo que presenta las siguientes etapas: (1) proporcionar una proteína de fusión según la invención y/o un homodímero según la invención, que presenta un marcador detectable, (2) introducir la proteína de fusión y/o el homodímero en el ser vivo, y (3) visualizar el enriquecimiento específico de la proteína de fusión en el ser vivo por medio de procedimientos de formación de imágenes, tales como tomografía por emisión de positrones (PET).  
40

Por medio de este procedimiento, debido al enriquecimiento selectivo de la proteína de fusión según la invención o del homodímero según la invención, pueden detectarse placas ateroscleróticas o altas concentraciones de LDL modificada, incluyendo oxLDL, lo que posibilita un diagnóstico fiable de enfermedades vasculares correspondientes o una predisposición a las mismas. De este modo, hasta el momento no puede detectarse adecuadamente la actividad y la estabilidad de placas ateroscleróticas en la angiografía, administración de agentes de contraste y medición del tamaño de la luz vascular usadas habitualmente en el estado de la técnica. La presente invención pone remedio a ello de forma eficaz.  
45  
50

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de la proteína de fusión según la invención, que presenta las siguientes etapas: (1) proporcionar una primera secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que se une específicamente a LDL modificada, preferentemente a oxLDL, (2) proporcionar una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que media la dimerización, (3) ligar la primera y segunda secuencia de nucleótidos para obtener una secuencia de fusión que codifica para la proteína de fusión, (4) clonar la secuencia de fusión en un vector de expresión, (5) introducir el vector de expresión en una célula adecuada para la expresión, (6) expresar la proteína de fusión en la célula, y (7) aislar la proteína de fusión a partir de la célula.  
55

5 A través de este procedimiento puede producirse también el homodímero según la invención, dado que células adecuadas, tales como por ejemplo células HEK o células CHO, que se transforman según la etapa (5), tras la expresión según la etapa (6) forman ya un homodímero que presenta puentes disulfuro en el segundo polipéptido, que conectan entre sí las dos proteínas de fusión según la invención. El homodímero se secreta por las células al medio extracelular.

Se entiende que las características mencionadas anteriormente y las que quedan aún por explicar no sólo pueden usarse en la combinación indicada en cada caso, sino también en otras combinaciones o individualmente, sin abandonar el contexto de la presente invención.

10 La presente invención se explica ahora en detalle por medio de ejemplos de realización que son de naturaleza meramente ejemplar y no limitan el alcance de la invención. A este respecto se hace referencia a las figuras adjuntas, en las que se representa lo siguiente:

La figura 1: detección de la proteína de fusión CD68-Fc dimérica fusionada en análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

15 La figura 2: diferenciación de células madre CD34<sup>+</sup> en células espumosas tras 10 días del cocultivo con trombocitos.

La figura 3: (A) captación de LDL acetilada por células espumosas; (B) inhibición de la formación de células espumosas mediante el homodímero CD68-Fc.

20 La figura 4: inhibición de la expresión de MMP-9 en el sobrenadante de células espumosas mediante incubación con concentraciones crecientes de CD68-Fc.

La figura 5: ELISA de Fc específico en placas ateroscleróticas *in vitro*.

La figura 6: aplicación *in vivo* de CD68-Fc marcado con J124 en ratones Apo-E ateroscleróticos y en ratones de tipo natural.

**Ejemplos de realización:**

25 1. Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos

En cada caso se usan los códigos de una letra habituales. En la representación, las secuencias de aminoácidos presentan en su extremo izquierdo el extremo amino o N terminal, y en su extremo derecho el extremo carboxilo o C terminal. Las secuencias de nucleótidos presentan en su extremo izquierdo el extremo 5', y en su extremo derecho el extremo 3'.

30 1.1 Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CD68 con polimorfismo 1 (glutamina) (SEQ ID No. 1)

**NDCPHKKSATLLPSFTVTPTVTESTGTTSHRTPKSHKTTTHRTTTTGTTSHGPTTATH  
 NPTTTSHGNVTVHPTSNSSTATSQGPSTATHSPATTSHGNATVHPTSNSSTATSPGFTSS  
 AHPEPPPPSPSPSPTSKETIGDYTWTNGSQPCVHLQAQIQIRVMYTTQGGGEAWGISV  
 LNPNKTKVQGSCEGAHPHLLLSFPYGHLSFGFMQDLQQKVYLSYMAVEYNVSFPHAA  
 QWTFSAQNASLRDLQAPLGQSFSCSNSSIILSPAVHLDLLSLRLQAAQLPHTGVFGQS  
 FSCPSDRS**

1.2 Secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio extracelular de CD68, polimorfismo 1 (SEQ ID No. 2)

AATGACTGTCCTCACAAAAATCAGCTACTTTGCTGCCATCCTTCACGGTGACACCCA  
 CGGTTACAGAGAGCACTGGAACAACCAGCCACAGGACTACCAAGAGCCACAAAACCAC  
 CACTCACAGGACAACCACCACAGGCACCACCAGCCACGGACCCACGACTGCCACTCAC  
 AACCCACCACCACCAGCCATGGAAACGTCACAGTTCATCCAACAAGCAATAGCACTG  
 CCACCAGCCAGGGACCCCTCAACTGCCACTCACAGTCTGCCACCAGTATGATGGAAA  
 TGCCACGGTTCATCCAACAAGCAACAGCACTGCCACCAGCCCAGGATTCACCAGTTCT  
 GCCACCCAGAACCACCTCCACCCTCTCCGAGTCTAGCCCAACCTCCAAGGAGACCA  
 TTGGAGACTACACGTGGACCAATGGTTCACAGCCCTGTGTCCACCTCCAAGCCCAGAT  
 TCAGATTCGAGTCATGTACACAACCAGGGTGGAGGAGAGGCCTGGGGCATCTCTGTA  
 CTGAACCCCAACAAAACCAAGGTCCAGGGAAGCTGTGAGGGTGCCCATCCCCACCTGC  
 TTCTCTCATTCCCCTATGGACACCTCAGCTTTGGATTCATGCAGGACCTCCAGCAGAA  
 GGTGTCTACCTGAGCTACATGGCGGTGGAGTACAATGTGTCTTCCCCACGCAGCA  
**CAGTGGACATTCTCGGCTCAGAATGCATCCCTTCGAGATCTCCAAGCACCCCTGGGGC**  
 AGAGCTTCAGTTGCAGCAACTCGAGCATCATTCTTTCACCAGCTGTCCACCTCGACCT  
 GCTCTCCCTGAGGCTCCAGGCTGCTCAGCTGCCCCACACAGGGGTCTTTGGGCAAAGT  
**TTCTCCTGCCCCAGTGACCGGTCC**

El polimorfismo 1 está en negrita.

1.3 Secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio extracelular de CD68, polimorfismo 2 (SEQ ID No. 3)

AATGACTGTCCTCACAAAAATCAGCTACTTTGCTGCCATCCTTCACGGTGACACCCA  
 CGGTTACAGAGAGCACTGGAACAACCAGCCACAGGACTACCAAGAGCCACAAAACCAC  
 CACTCACAGGACAACCACCACAGGCACCACCAGCCACGGACCCACGACTGCCACTCAC  
 AACCCACCACCACCAGCCATGGAAACGTCACAGTTCATCCAACAAGCAATAGCACTG  
 CCACCAGCCAGGGACCCCTCAACTGCCACTCACAGTCTGCCACCAGTATGATGGAAA  
 TGCCACGGTTCATCCAACAAGCAACAGCACTGCCACCAGCCCAGGATTCACCAGTTCT  
 GCCACCCAGAACCACCTCCACCCTCTCCGAGTCTAGCCCAACCTCCAAGGAGACCA  
 TTGGAGACTACACGTGGACCAATGGTTCACAGCCCTGTGTCCACCTCCAAGCCCAGAT  
 TCAGATTCGAGTCATGTACACAACCAGGGTGGAGGAGAGGCCTGGGGCATCTCTGTA  
 CTGAACCCCAACAAAACCAAGGTCCAGGGAAGCTGTGAGGGTGCCCATCCCCACCTGC  
 TTCTCTCATTCCCCTATGGACACCTCAGCTTTGGATTCATGCAGGACCTCCAGCAGAA  
 GGTGTCTACCTGAGCTACATGGCGGTGGAGTACAATGTGTCTTCCCCACGCAGCA  
**AAGTGGACATTCTCGGCTCAGAATGCATCCCTTCGAGATCTCCAAGCACCCCTGGGGC**  
 AGAGCTTCAGTTGCAGCAACTCGAGCATCATTCTTTCACCAGCTGTCCACCTCGACCT  
 GCTCTCCCTGAGGCTCCAGGCTGCTCAGCTGCCCCACACAGGGGTCTTTGGGCAAAGT  
**TTCTCCTGCCCCAGTGACCGGTCC**

El polimorfismo 2 está en negrita.

1.4 Secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido que se deriva del dominio Fc y que media la dimerización (SEQ ID No. 4)

**ESKSCDKTHTCPPCPAPEAAAAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV °**  
**KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAS**  
**IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN**  
**NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

5 1.5 Secuencia de nucleótidos que codifica para el segundo polipéptido que se deriva del dominio Fc y que media la dimerización (SEQ ID No. 5)

**GAGTCTAAGTCCTGTGATAAGACTCATACCTGCCCCCCTGCCAGCACCCGAGGCAG**  
**CAGCCGCCCCCTCAGTGTTCCTTCCCTCCAAAACCAAGGATACCCTGATGATCAG**  
**CCGTACACCTGAGGTCACCTGCGTAGTCGTGATGTGTCTCACGAGGACCCGGAGGTG**  
**AAGTTTAATTGGTATGTGGACGGGGTAGAAGTGCATAATGCCAAGACTAAACCTCGAG**  
**AGGAACAATATAACTCCACCTATAGGGTGGTCAGCGTTCTCACGGTCCTTCACCAGGA**  
**CTGGTTGAATGGAAAGGAATACAAGTGTAAAGGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCGCTTCC**  
**ATAGAAAAGACAATCTCCAAAGCTAAAGGGCAGCCACGGGAACCTCAGGTGTACACC**  
**TGCCGCCTAGCAGAGATGAGCTCACAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGCTTGGTGAA**  
**GGGTTTCTATCCTTCGGACATTGCCGTTGAGTGGGAAAGTAACGGCCAGCCTGAGAAT**  
**AACTACAAGACCACACCACCCGTTCTTGACTCTGATGGGAGTTTCTTTTGTACAGTA**  
**AGTTAACTGTGACAAATCACGCTGGCAGCAAGGAAATGTTTTCTTGTTCGCGTAT**  
**GCACGAGGCACTGCACAACCATTACACTCAGAAATCCCTGAGCCTATCACCAGGCAA**  
**TAA**

1.6 Secuencia de aminoácidos del constructo CD68-Fc total, incluyendo elemento de unión (SEQ ID No. 6)

**NDCPHKKSATLLPSFTVPTVTESTGTTSHRTTKSHKTTTHRTTTTGTTSHGPTTATH**  
**NPTTTSHGNTVHPTSNSSTATSQGPSTATHSPATTSHGNATVHPTSNSSTATSPGFTSS**  
**AHPEPPPPSPSPSPTSKETIGDYTWNGSQPCVHLQAQIQIRVMYTTQGGGEAWGISV**  
**LNPNTKVQGSCEGAHPHLLLSFPYGHLSFGFMQDLQKVVYLSYMAVEYNVSPHAA**  
**QWTFSAQNASLRDLQAPLGQSFSCSNSSIILSPAVHLDLLSLRLQAAQLPHTGVFGQS**  
**FSCPSDRSGGRESKSCDKTHTCPPCPAPEAAAAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV**  
**VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK**  
**CKVSNKALPASIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA**  
**VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHY**  
**TQKSLSLSPGK**

10 El elemento de unión está subrayado. Delante del elemento de unión (en la dirección del extremo N terminal) se

encuentra el segmento del dominio extracelular de CD68, después del elemento de unión (en la dirección del extremo C terminal) se encuentra el segmento del polipéptido que se deriva del dominio Fc y que media la dimerización.

5 1.7 Secuencia de nucleótidos que codifica para el constructo total incluyendo el elemento de unión, polimorfismo 1 (SEQ ID No. 7)

**AATGACTGTCCTCACAAAAATCAGCTACTTTGCTGCCATCCTTCACGGTGACACCCA**  
**CGGTTACAGAGAGCACTGGAACAACCAGCCACAGGACTACCAAGAGCCACAAAACCAC**  
**CACTCACAGGACAACCACCACAGGCACCACCAGCCACGGACCCACGACTGCCACTCAC**  
**AACCCACCACCACCAGCCATGGAAACGTACAGTTCATCCAACAAGCAATAGCACTG**  
**CCACCAGCCAGGGACCCCTCAACTGCCACTCACAGTCCTGCCACCCTAGTCATGGAAA**  
**TGCCACGGTTCATCCAACAAGCAACAGCACTGCCACCAGCCCAGGATTCACCAGTTCT**  
**GCCCACCCAGAACCACCTCCACCCTCTCCGAGTCCTAGCCCAACCTCCAAGGAGACCA**  
**TTGGAGACTACACGTGGACCAATGGTTCAGCCCTGTGTCCACCTCCAAGCCCAGAT**  
**TCAGATTCGAGTCATGTACACAACCCAGGGTGGAGGAGAGGCCTGGGGCATCTCTGTA**  
**CTGAACCCCAACAAAACCAAGTCCAGGGAAGCTGTGAGGGTGCCCATCCCCACCTGC**  
**TTCTCTCATTCCCCTATGGACACCTCAGCTTTGGATTCATGCAGGACCTCCAGCAGAA**  
**GGTTGTCTACCTGAGCTACATGGCGGTGGAGTACAATGTGTCCTTCCCCACGCAGCA**  
**CAGTGGACATTCTCGGCTCAGAATGCATCCCTTCGAGATCTCCAAGCACCCCTGGGGC**  
**AGAGCTTCAGTTGCAGCAACTCGAGCATCATTCTTTCACCAGCTGTCCACCTCGACCT**  
**GCTCTCCCTGAGGCTCCAGGCTGCTCAGCTGCCCCACACAGGGGTCTTTGGGCAAAGT**  
**TTCTCCTGCCCCAGTGACCGGTCCGGCGGCCGCGAGTCTAAGTCTGTGATAAGACTC**  
**ATACCTGCCCCCCTGCCAGCACCCGAGGCAGCAGCCGCCCCCTCAGTGTTTCTCTT**  
**CCCTCCAAAACCCAAGGATACCCTGATGATCAGCCGTACACCTGAGGTCACCTGCGTA**  
**GTGTCGATGTGTCTCACGAGGACCCGGAGGTGAAGTTTAATTGGTATGTGGACGGGG**  
**TAGAAGTGCATAATGCCAAGACTAAACCTCGAGAGGAACAATATAACTCCACCTATAG**  
**GGTGGTCAGCGTTCTCACGGTCCCTCACCAGGACTGGTTGAATGGAAAGGAATACAAG**  
**TGTAAGGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCGCTTCATAGAAAAGACAATCTCAAAGCTA**  
**AAGGGCAGCCACGGGAACCTCAGGTGTACACCCTGCCGCCTAGCAGAGATGAGCTCAC**  
**AAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGCTTGGTGAAGGGTTTCTATCCTTCGGACATTGCC**  
**GTTGAGTGGGAAAGTAACGGCCAGCCTGAGAATAACTACAAGACCACACCACCCGTTT**  
**TTGACTCTGATGGGAGTTTCTTTTTGTACAGTAAGTTAACTGTGACAAATCACGCTG**  
**GCAGCAAGGAAATGTTTTCTCTTGTTCGGTGATGCACGAGGCACTGCACAACCATTAC**  
**ACTCAGAAATCCCTGAGCCTATCACCAGGCAAATAA**

10 La secuencia codificante para el elemento de unión está subrayada. Después de la secuencia codificante para el elemento de unión (en la dirección del extremo N terminal) se encuentra el segmento que codifica para el dominio extracelular de CD68, estando en negrita el polimorfismo 1, después de la secuencia codificante para el elemento de unión (en la dirección del extremo C terminal) se encuentra el segmento que codifica para el segundo polipéptido

que media la dimerización, que se deriva del fragmento Fc.

1.8 Secuencia de nucleótidos que codifica para el constructo total incluyendo el elemento de unión, polimorfismo 2 (SEQ ID No. 8)

**AATGACTGTCCTCACAAAAATCAGCTACTTTGCTGCCATCCTTCACGGTGACACCCA**  
**CGGTTACAGAGAGCACTGGAACAACCAGCCACAGGACTACCAAGAGCCACAAAACCAC**  
**CACTCACAGGACAACCACCACAGGCACCACCAGCCACGGACCCACGACTGCCACTCAC**  
**AACCCACCACCACCAGCCATGGAAACGTCACAGTTCATCCAACAAGCAATAGCACTG**  
**CCACCAGCCAGGGACCCCTCAACTGCCACTCACAGTCCTGCCACCACTAGTCATGGAAA**  
**TGCCACGGTTCATCCAACAAGCAACAGCACTGCCACCAGCCCAGGATTCACCAGTTCT**  
**GCCCACCCAGAACCACCTCCACCCTCTCCGAGTCCTAGCCCAACCTCCAAGGAGACCA**  
**TTGGAGACTACACGTGGACCAATGGTTCAGCCCTGTGTCCACCTCCAAGCCAGAT**  
**TCAGATTCGAGTCATGTACACAACCCAGGGTGGAGGAGAGGCCTGGGGCATCTCTGTA**  
**CTGAACCCCAACAAAACCAAGGTCCAGGGAAGCTGTGAGGGTGCCCATCCCCACCTGC**  
**TTCTCTCATTCCCCTATGGACACCTCAGCTTTGGATTTCATGCAGGACCTCCAGCAGAA**  
**GGTTGTCTACCTGAGCTACATGGCGGTGGAGTACAATGTGTCCTTCCCCCACGCAGCA**  
**AAGTGGACATTCTCGGCTCAGAATGCATCCCTTCGAGATCTCCAAGCACCCCTGGGGC**  
**AGAGCTTCAGTTGCAGCAACTCGAGCATCATTCTTTCACCAGCTGTCCACCTCGACCT**  
**GCTCTCCCTGAGGCTCCAGGCTGCTCAGCTGCCCCACACAGGGGTCTTTGGGCAAAGT**  
**TTCTCCTGCCCCAGTGACCGGTCCGGCGGCCGCGAGTCTAAGTCCTGTGATAAGACTC**  
**ATACCTGCCCCCCTGCCAGCACCCGAGGCAGCAGCCGCCCCCTCAGTGTTTCTCTT**  
**CCCTCCAAAACCAAGGATACCCTGATGATCAGCCGTACACCTGAGGTCACCTGCGTA**  
**GTCGTCGATGTGTCTCACGAGGACCCGGAGGTGAAGTTTAATTGGTATGTGGACGGGG**  
**TAGAAGTGCATAATGCCAAGACTAAACCTCGAGAGGAACAATATAACTCCACCTATAG**  
**GGTGGTCAGCGTTCTCACGGTCCTTACCAGGACTGGTTGAATGGAAAGGAATACAAG**  
**TGTAAGGTGAGCAACAAGCCCTGCCCGCTTCCATAGAAAAGACAATCTCCAAAGCTA**  
**AAGGGCAGCCACGGGAACCTCAGGTGTACACCCTGCCGCCTAGCAGAGATGAGCTCAC**  
**AAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGCTTGGTGAAGGGTTTCTATCCTTCGGACATTGCC**  
**GTTGAGTGGGAAAGTAACGGCCAGCCTGAGAATAACTACAAGACCACACCACCCGTTT**  
**TTGACTCTGATGGGAGTTTCTTTTTGTACAGTAAGTTAACTGTGACAAATCACGCTG**  
**GCAGCAAGGAAATGTTTTCTTTGTTCCGTGATGCACGAGGCACTGCACAACCATTAC**  
**ACTCAGAAATCCCTGAGCCTATCACCAGGCAAATAA**

5

La secuencia codificante para el elemento de unión está subrayada. Después de la secuencia codificante para el elemento de unión (en la dirección del extremo N terminal) se encuentra el segmento que codifica para el dominio extracelular de CD68, estando en negrita el polimorfismo 2, después de la secuencia codificante para el elemento de unión (en la dirección del extremo C terminal) se encuentra el segmento que codifica para el segundo péptido que media la dimerización, que se deriva del fragmento Fc.

10

2. Clonación de la proteína de fusión CD68-Fc

5 El dominio extracelular de CD68 humana se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso de cebadores específicos a partir de una biblioteca de ADNc de macrófagos recién preparados. A este respecto se introdujeron en los extremos del fragmento nuevos sitios de restricción. El fragmento se clonó en un plásmido que para una mejor secreción presenta una secuencia líder de la cadena kappa de Ig humana, con la que se substituyó la secuencia líder de CD68. Se sintetizó un gen sintético que se deriva del dominio Fc de IgG1 humana. Mediante mutagénesis dirigida se intercambió en la posición 331 una prolina por una serina y en las posiciones de aminoácido 234 a 237 el tetrapéptido Leu-Leu-Gly-Gly por Ala-Ala-Ala-Ala. Para facilitar la expresión del péptido se optimizó con codón este polipéptido también para células CHO. Los dos fragmentos se digirieron por restricción y se alearon en sus extremos respectivos, de modo que la parte de Fc se conecta a la parte de CD68. A este respecto se generó una secuencia de conexión específica entre las dos partes de la proteína de fusión, que está compuesta por tres aminoácidos. A continuación se representa el ADNc de fusión que resulta de ello:

**ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT**  
**GACGCGGCCAGCCGGCCAGGCGCGCGCCGTACGAAGCTT**aatgactgtcctcaca-  
 aaaatcagctactttgctgccatccttcacgggtgacacccacggttacagagagcactg-  
 gaacaaccagccacaggactaccaagagccacaaaaccaccactcacaggacaaccac-  
 cacaggcaccaccagccacggacccacgactgccactcacaaccccaccaccaccagc-  
 catggaaacgtcacagttcatccaacaagcaatagcactgccaccagccagggaccct-  
 caactgccactcacagtcctgccaccactagtcatggaaatgccacggttcatcaa-

caagcaacagcaactgccaccagcccaggattcaccagttctgcccaccagaac-  
cacctccaccctctccgagtcctagcccaacctccaaggagaccattggagacta-  
cacgtggaccaatggttcccagccctgtgtccacctccaagcccagattcagattc-  
gagtcattgtacacaaccaggggtggaggagaggcctggggcatctctgtactgaacc-  
caacaaaaccaaggtccaggaagctgtgaggggtgccatccccacctgcttctct-  
cattcccctatggacacctcagctttggattcatgcaggacctccagcagaaggttgc-  
tacctgagctacatggcgggtggagtacaatgtgtccttccccacgcagcacagtgga-  
cattctcggt

**polimorfismo cag/aag-**

cagaatgcatcccttcgagatctccaagcaccctggggcagagcttcagttgcag-  
caactcgagcatcattctttcaccagctgtccacctcgacctgctctccctgaggctc-  
caggctgctcagctgccccacacaggggtctttgggcaaagtttctcctgccccagt-  
gaccggtccGGCGGCCGGAGTCTAAGTCTGTGATAAGACTCA-  
**TACCTGCCCCCCTGCCAGCACCCGAGGCAGCAGCCGCCCCCTCAGTGTCTCTTCCC**  
**TCCAAAACCCAAGGATACCCTGATGATCAGCCGTACACCTGAGGTCACCTGCGTAGTCGT**  
**CGATGTGTCTCACGAGGACCCGGAGGTGAAGTTTAATTGGTATGTGGACGGGGTAGAAGT**  
**GCATAATGCCAAGACTAAACCTCGAGAGGAACAATATAACTCCACCTATAGGGTGGTCAG**  
**CGTTCTCACGGTCCTTACCAGGACTGGTTGAATGGAAAGGAATACAAGTGTAAAGGTGAG**  
**CAACAAAGCCCTGCCCGCTTCCATAGAAAAGACAATCTCCAAAGCTAAAGGGCAGCCAGC**  
**GGAACCTCAGGTGTACACCCTGCCGCCTAGCAGAGATGAGCTCACAAAGAACCAGGTGTC**  
**TCTGACATGCTTGGTGAAGGGTTTCTATCCTTCGGACATTGCCGTTGAGTGGGAAAGTAA**  
**CGGCCAGCCTGAGAATAACTACAAGACCACACCACCCGTTCTTGACTCTGATGGGAGTTT**  
**CTTTTTGTACAGTAAGTTAACTGTCGACAAATCACGCTGGCAGCAAGGAAATGTTTTCTC**  
**TTGTTCCGTGATGCACGAGGCACTGCACAACCATTACACTCAGAAATCCCTGAGCCTATC**  
**ACCAGGCAAATAA**

- 5 El líder de IgG (cadena kappa de Ig humana) incluyendo los aminoácidos en cuanto a la construcción del MCS están representados en la zona del comienzo de la molécula por medio de mayúsculas así como negritas (líder de IgG) y subrayados (MCS), a continuación sigue el dominio extracelular de CD68 humana, que está representado por medio de minúsculas, un polimorfismo cag-aag está representado en negrita; a esto le sigue a continuación un segmento de conexión que presenta nueve nucleótidos y que está representado en mayúsculas y subrayado; a esto le sigue a continuación la secuencia codificante para el polipéptido que se deriva del fragmento Fc, que se optimizó con codón de CHO y está mutado en la región de unión al receptor de Fc y al complemento.

La proteína de fusión codificada está representada esquemáticamente a continuación:

	<b>Péptido líder</b>	<b>Espaciador de MCS</b>	<b>CD68</b>		
1	<b>METDTLLLWV</b>	<b>LLLWVPGSTG</b>	<u><b>DAAOPARRAR</b></u>	<b>RTKLNDCPHK</b>	<b>KSATLLPSFT</b>
51	<b>VTPTVTESTG</b>	<b>TTSRRTTKSH</b>	<b>KTTTHRTTTT</b>	<b>GTTSHGPTTA</b>	<b>THNPPTTSHG</b>
101	<b>NVTVHPTSNS</b>	<b>TATSQGPSTA</b>	<b>THSPATTSHG</b>	<b>NATVHPTSNS</b>	<b>TATSPGFTSS</b>
151	<b>AHPEPPPPSP</b>	<b>SPSPTSKETI</b>	<b>GDYTWNGSQ</b>	<b>PCVHLQAQIQ</b>	<b>IRVMYTTQGG</b>
201	<b>GEAWGISVLN</b>	<b>PNKTKVQGSC</b>	<b>EGAHPHLLLS</b>	<b>FPYGHLSFGF</b>	<b>MQDLQQKVYV</b>
251	<b>LSYMAVEYNV</b>	<b>SFPHAAQWTF</b>	<b>SAQNASLRDL</b>	<b>QAPLGQSFSC</b>	<b>SNSSIILSPA</b>
301	<b>VHLDLLSLRL</b>	<b>QAAQLPHTGV</b>	<b>FGQSFSCPSD</b>	<u><b>RSGGRESKSC</b></u>	<b>DKTHTCPPCP</b>
			<b>Conexión</b>		<b>hIgG1mut</b>
351	<b>APEAAAAPSV</b>	<b>FLFPPKPKDT</b>	<b>LMISRTPEVT</b>	<b>CVVVDVSHED</b>	<b>PEVKFNWYVD</b>
401	<b>GVEVHNAKTK</b>	<b>PREEQYNSTY</b>	<b>RVVSVLTVLH</b>	<b>QDWLNGKEYK</b>	<b>CKVSNKALPA</b>
451	<b>SIEKTISKAK</b>	<b>GQPREPQVYT</b>	<b>LPPSRDELTK</b>	<b>NQVSLTCLVK</b>	<b>GFYPSDIAVE</b>
501	<b>WESNGQPENN</b>	<b>YKTPPVLDL</b>	<b>DGSFFLYSKL</b>	<b>TVDKSRWQQG</b>	<b>NVFSCSVMHE</b>
551	<b>ALHNHYTQKS</b>	<b>LSLSPGK*</b>			

- 5 El péptido líder está representado por medio de negrita (este segmento ya no se encuentra en la proteína de fusión según la invención preferentemente o sólo se encuentran segmentos del mismo), seguido del espaciador de MCS, que está representado subrayado (este segmento puede faltar asimismo en la proteína de fusión según la invención, pero también puede estar presente), seguido del dominio extracelular de CD68 humana, seguido del elemento de conexión que comprende 3 aminoácidos, que está asimismo representado subrayado, seguido del polipéptido que se deriva del fragmento Fc de la molécula de IgG1 humana, que se optimizó con codón de CHO y está mutado en la región de unión al receptor de Fc y al complemento (hIgG1mut). El "\*" en el extremo carboxilo terminal representa el codón de parada.
- 10 El ADNc de fusión se digirió de nuevo por restricción y se introdujo en un vector de plásmido pcDNA5 (Invitrogen) por medio clonación clásica. El vector de plásmido resultante se denomina como pcDNA5-FRT-CD68-Fc-opt.
3. Producción de células CHO que expresan de manera estable la proteína de fusión CD68-Fc
- 15 Se cotransfectaron células CHO Flp-In™ (Invitrogen) a una confluencia del 70 % en una relación de 9:1 con los plásmidos pOG44:pcDNA5-FRT-CD68-Fc-opt (ambos de Invitrogen). 24 horas después de la transfección se lavaron las células y se añadió medio reciente. 48 horas después de la transfección se transfirieron las células 1:20 a medio reciente que contenía higromicina 500 mg/ml. Los focos resistentes a higromicina se aislaron y expandieron.
- 20 Los transformantes expandidos se analizaron en cuanto a la expresión de la proteína de fusión CD68-Fc (figura 1: CD68-Fc) por medio de análisis de inmunotransferencia de tipo Western (SDS-PAGE) con el uso de anticuerpos, que estaban dirigidos contra Fc humano. Se usó un anticuerpo secundario anti-Fc humano. Como control sirvió la proteína Fc (figura 1: Fc), que no presentaba ningún dominio de CD68 extracelular. A este respecto se mostró para CD68-Fc en condiciones no reductoras, una banda específica a 160 kDa (figura 1, a la izquierda), en condiciones reductoras a 115 kDa (figura 1, a la derecha).
- 25 Asimismo se realizó una detección cuantitativa con ayuda de un ELISA de IgG humana. A este respecto pudo detectarse en el sobrenadante de cultivo celular de la línea celular CHO productora una concentración de CD68-Fc de aproximadamente 2 mg/ml, mientras que en el caso de células de tipo natural no pudo encontrarse ninguna proteína de fusión CD68-Fc.

#### 4. Purificación de la proteína de fusión CD68-Fc

Se cultivaron las células CHO que expresan de manera estable la proteína de fusión CD68-Fc. Tres días tras la infección se separó por centrifugación el sobrenadante de cultivo a 3800 g durante 30 min. a 4 °C y se filtró a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2 µm. La proteína de fusión CD68-Fc se precipitó mediante la adición de 1,2 volúmenes de sulfato de amonio (761 g/l) y agitación durante la noche a 4 °C.

Las proteínas se sedimentaron mediante centrifugación a 3000 g durante 30 min. a 4 °C, se disolvieron 0,1 volúmenes de PBS y se dializaron durante la noche a 4 °C en PBS. La disolución de proteína se aclaró mediante centrifugación a 14000 g durante 30 min. a 4 °C y filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2 µm y se cargó en una columna de proteína A (HiTrap™) Protein A HP, (Amersham Pharmacia Wiotech AB, Upsalla, Suecia), que se había equilibrado previamente con tampón de unión (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,0, NaN<sub>3</sub> al 0,02 %). La columna se lavó con tampón de unión hasta una DO<sub>280</sub> < 0,01 y se eluyó con tampón de elución (glicina 100 mM pH 2,7).

Las fracciones eluidas de 900 µl en cada caso se neutralizaron con 100 µl de tampón de neutralización (Tris-HCl 1 M pH 9,0, NaN<sub>3</sub> al 0,02 %), se reunieron, se dializaron durante la noche en PBS a 4 °C, se tomaron alícuotas y se congelaron a -20 °C. La columna se neutralizó con tampón de unión, se lavó con etanol al 20 % (v/v) y se almacenó en un frigorífico.

#### 5. Diferenciación de células madre CD34<sup>+</sup> en células espumosas mediante cocultivo con trombocitos

Para aislar trombocitos humanos se extrajo sangre venosa de sujetos de prueba sanos y se reunió en tampón ácido-citrato-dextrosa (ACD). Tras la centrifugación a 430 g durante 20 min. se extrajo el plasma enriquecido con trombocitos [*Platelet-Rich Plasma* (PRP)], se añadió a tampón Tyrodes-HEPES (HEPES 2,5 mM, NaCl 150 mM, HCl 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36 mM, glucosa 5,5 mM, BSA 1 mg/ml, pH 6,5) y se centrifugó a 900 g durante 10 min. Tras la eliminación del sobrenadante se resuspendió el sedimento de trombocitos obtenido en tampón Tyrodes-HEPES (pH 7,4).

Este procedimiento lleva a una elevada pureza de los trombocitos sin contaminaciones medibles por células de núcleo polimórfico o monocitos, lo que se verificó por la ausencia de CD14 (citometría de flujo y ELISA de mieloperoxidasa). El procedimiento anterior se describe en Langer H. y col. (2006; elektronisch 2005), Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells *in vitro*, Circ. Res. 98(2): e2-10.

Se aislaron células CD34<sup>+</sup> humanas a partir de sangre de cordón umbilical. Ésta se obtuvo tras autorización del comité ético local de mujeres sanas directamente tras el nacimiento de un niño. Las células aisladas eran al menos al 95 % positivas para CD34<sup>+</sup>, lo que se confirmó por medio análisis de citometría de flujo tras el aislamiento respectivo. Se obtuvieron células mononucleares humanas mediante centrifugación en gradiente de densidad en una disolución de separación Biocoll (BIOCROM Berlín, Alemania) a 600 g durante 15 min. también a partir de sangre de cordón umbilical. Las células CD34<sup>+</sup> se enriquecieron mediante selección de inmunoafinidad (CD34 Progenitor Cell Isolation Kit; Milteenyi Biotec, Bergisch Glattbach, Alemania), concretamente según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron a continuación en placas de 96 pocillos, que se habían recubierto con gelatina al 0,2 %. Para el cultivo celular se usaron IMDM con Glutamax, mezclado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 5 %, penicilina-estreptomina 100 mg/ml, MEM-vitaminas al 1 % y aminoácidos no esenciales al 1 %, que todos se adquirieron de Gibco (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Las células progenitoras CD34<sup>+</sup> (50.000 células) se cocultivaron con trombocitos (2 x 10<sup>8</sup> ml) en placas de 96 pocillos, que se habían recubierto previamente con gelatina al 0,2 %, a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 10 días. El desarrollo de células espumosas se contó en seis ventanas por medio de microscopía de contraste de fases.

A este respecto se mostró en la microscopía de contraste de fases una diferenciación de células madre CD34<sup>+</sup> en células espumosas, tal como se representa en la figura 2A. En la fotografía de la izquierda se muestran células CD34<sup>+</sup> control sin formación de células espumosas, en la fotografía de la derecha se muestra la formación de células espumosas en presencia de trombocitos (flecha). Que las "células gigantes" que se generan mediante el cocultivo de células CD34<sup>+</sup> y trombocitos representan verdaderamente células espumosas, se prueba mediante tinción de inmunofluorescencia positiva del receptor-eliminador CD68 (figura 2B) y fotografías de microscopía electrónica de transmisión, que representan una célula espumosa (figura 2C).

#### 6. Caracterización funcional de las células espumosas obtenidas

Para poder caracterizar funcionalmente las células espumosas formadas *in vitro*, se sometió a ensayo si éstas pueden captar LDL acetilada (acLDL). Para ello tuvo lugar una incubación de las células espumosas obtenidas con acLDL marcada con fluorescencia (Dil-AcLDL) y una tinción de los gránulos densos con Mepacrine. Una fotografía por microscopía de láser confocal posterior demostró claramente la captación de acLDL en las células espumosas obtenidas y con ello su funcionalidad; véase la figura 3A, barra de escala 25 µm.

Asimismo se usó el método de medición de ROS (*Reactive Oxygen Species*) (especies reactivas del oxígeno). De manera característica, durante un proceso inflamatorio penetran monocitos en la pared vascular, se diferencia en

ella para dar macrófagos y producen citocinas, proteasas, tales como la metaloproteínasa de matriz (MMP) y factores del complemento, pero también radicales libres oxidados, es decir ROS. Para las células espumosas que se generan mediante la coincubación de células madre CD34<sup>+</sup> con trombocitos *in vitro* se comprobó que éstas liberan ROS y también producen metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9). De esta manera se demostró también que se

5

#### 7. Inhibición de la formación y funciones de células espumosas mediante la proteína de fusión CD68-Fc

Se generaron células espumosas mediante coincubación de 10 días de células madre CD34<sup>+</sup> con trombocitos *in vitro*. Una parte de los cultivos se trató con homodímeros CD68-Fc, otra parte para el control con Fc puro. A continuación se examinó mediante microscopía si mediante la incubación con homodímeros CD68-Fc se inhibía la formación de células espumosas. El resultado se representa en la figura 3B. A este respecto se muestra que un tratamiento con Fc (imagen parcial de la izquierda) deja no afectada la formación de células espumosas, mientras que el tratamiento con homodímeros CD68-Fc (imagen parcial de la derecha) inhibía la formación de células espumosas.

10

En la figura 3C está representada la dependencia de la reducción de la formación de células espumosas de la dosis de homodímero CD68-Fc. A una concentración de homodímero CD68-Fc 400 µg/ml se inhibe prácticamente de forma completa la formación de células espumosas. Como control se usó a su vez Fc puro.

15

Asimismo, en un experimento adicional se comprobó que se inhibe la expresión de MMP-9 en el sobrenadante de células espumosas mediante incubación con concentraciones crecientes de homodímero CD68-Fc en comparación con proteína control. El resultado de este experimento está representado en la figura 4. Las bandas corresponden al nivel de expresión para MMP-9. Están representados en los respectivos carriles las siguientes mezclas madre: 1. CD34 control, 2. CD34 control, 3. proteína control 100 g/ml, 4. proteína control 400 µg/ml, 5. homodímero CD68-Fc 100 g/ml, 6. homodímero CD68-Fc 200 g/ml, 7. homodímero CD68-Fc 400 g/ml, 8. fluvastatina 1 µM. A este respecto se mostró que la presencia de homodímero CD68-Fc (carriles 5, 6 y 7) lleva a una clara inhibición de la formación de MMP-9 por las células espumosas, de manera similar a mediante la estatina adecuadamente caracterizada fluvastatina (carril 8).

20

25

#### 8. Proteína de fusión CD68-Fc como agente diagnóstico

Placas ateroscleróticas de la carótida de pacientes que se extrajeron en el contexto de una operación, se trituraron, suspendieron, se transfirieron a placas de cultivo y se secaron. Después se realizó un ELISA específico con respecto a la parte de Fc de la CD68 o GPVI o Fc puro. El resultado está representado en la figura 5A. En paralelo a esto se realizaron exámenes inmunohistológicos de tejido humano de preparaciones de tromboendarterectomía de la arteria carótida. El resultado está representado en la figura 5B.

30

En ambos casos se muestra que tiene lugar una unión significativa de proteína de fusión CD68-Fc a tejido de placa aterosclerótica en comparación con la proteína Fc control (Fc) que no presenta una unión específica al tejido de placa. Como control positivo se usó una proteína que se une a estructuras de colágeno en tejido de placa humano (control).

35

Asimismo se realizó una aplicación *in vivo* de CD68-Fc marcada con J124 en ratones Apo-E ateroscleróticos y en ratones de tipo natural. La CD68-Fc marcada con J124 se aplicó en ratones ateroscleróticos de 24 semanas de edad o en ratones de tipo natural control sin aterosclerosis esencial. Después se extirparon los órganos y se examinó *ex vivo* mediante autorradiografía la arteria carótida bds. y el arco aórtico. El resultado se muestra en la figura 6.

40

Tal como se representa en la imagen parcial (A), se muestra una radioactividad claramente aumentada en segmentos vasculares ateroscleróticos en comparación con vasos no ateroscleróticos. Una tinción Ölrot y correspondiente autorradiografía se muestra en la imagen parcial (B). La imagen parcial (C) muestra una valoración cuantitativa de la autorradiografía.

45

Se muestra que los vaso ateroscleróticos (arco aórtico) extraídos de los ratones ApoE presentan un enriquecimiento aumentado considerable de proteína de fusión CD68-Fc marcada con J124 en comparación con vasos no ateroscleróticos extraídos de ratones de tipo natural. No se encuentra ningún enriquecimiento aumentado significativo en ratones ApoE de proteína de fusión CD68-Fc en la región de la arteria carótida en comparación con el tipo natural.

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> Eberhard-Karls-Universität, Universitätsklinikum Tübingen

<120> Proteína de fusión antiinflamatoria

<130> 5402P362

5 <160> 8

<170> PatentIn Versión 3.3

<210> 1

<211> 298

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

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

ES 2 379 113 T3

130						135						140			
Ser	Gln	Pro	Cys	Val	His	Leu	Gln	Ala	Gln	Ile	Gln	Ile	Arg	Val	Met
145					150					155					160
Tyr	Thr	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	Glu	Ala	Trp	Gly	Ile	Ser	Val	Leu	Asn
				165					170					175	
Pro	Asn	Lys	Thr	Lys	Val	Gln	Gly	Ser	Cys	Glu	Gly	Ala	His	Pro	His
			180					185					190		
Leu	Leu	Leu	Ser	Phe	Pro	Tyr	Gly	His	Leu	Ser	Phe	Gly	Phe	Met	Gln
		195					200					205			
Asp	Leu	Gln	Gln	Lys	Val	Val	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Met	Ala	Val	Glu	Tyr
	210					215					220				
Asn	Val	Ser	Phe	Pro	His	Ala	Ala	Gln	Trp	Thr	Phe	Ser	Ala	Gln	Asn
225					230					235					240
Ala	Ser	Leu	Arg	Asp	Leu	Gln	Ala	Pro	Leu	Gly	Gln	Ser	Phe	Ser	Cys
				245					250					255	
Ser	Asn	Ser	Ser	Ile	Ile	Leu	Ser	Pro	Ala	Val	His	Leu	Asp	Leu	Leu
			260					265					270		
Ser	Leu	Arg	Leu	Gln	Ala	Ala	Gln	Leu	Pro	His	Thr	Gly	Val	Phe	Gly
		275					280					285			
Gln	Ser	Phe	Ser	Cys	Pro	Ser	Asp	Arg	Ser						
	290					295									

<210> 2  
 <211> 894  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

aatgactgtc	ctcaca	aaaa	atcagctact	ttgctgccat	ccttcacggt	gacacc	cacg	60
gttacagaga	gcactggaac	aaccagccac	aggactacca	agagccacaa	aaccaccact			120
cacaggacaa	ccaccacagg	caccaccagc	caaggaccca	cgactgccac	tcacaacccc			180
accaccacca	gcatggaaa	cgtcacagtt	catccaacaa	gcaatagcac	tgccaccagc			240

ES 2 379 113 T3

cagggaccct caactgccac tcacagtctt gccaccacta gtcattggaaa tgccaccggtt 300  
 catccaacaa gcaacagcac tgccaccagc ccaggattca ccagttctgc ccaccagaa 360  
 ccacctccac cctctccgag tcctagccca acctccaagg agaccattgg agactacacg 420  
 tggaccaatg gttcccagcc ctgtgtccac ctccaagccc agattcagat tcgagtcatt 480  
 tacacaaccc aggggtggagg agaggcctgg ggcattctctg tactgaaccc caacaaaacc 540  
 aagggtccagg gaagctgtga ggggtgccat cccacactgc ttctctcatt ccctatgga 600  
 cacctcagct ttggattcat gcaggacctc cagcagaagg ttgtctacct gagctacatg 660  
 gcggtggagt acaatgtgtc cttccccac gcagcacagt ggacattctc ggctcagaat 720  
 gcatcccttc gagatctcca agcaccctg gggcagagct tcagttgcag caactcgagc 780  
 atcattcttt caccagctgt ccacctcgac ctgctctccc tgaggctcca ggctgctcag 840  
 ctgccccaca caggggtctt tgggcaaagt ttctctgcc ccagtgaccg gtcc 894

<210> 3  
 <211> 894  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 3

5

aatgactgtc ctcacaaaa atcagctact ttgtgcat ccttcacggt gacaccacg 60  
 gttacagaga gcaactggaac aaccagccac aggactacca agagccacaa aaccaccact 120  
 cacaggacaa ccaccacagg caccaccagc caggaccca cgactgccac tcaacaaccc 180  
 accaccacca gccatggaaa cgtcacagtt catccaacaa gcaatagcac tgccaccagc 240  
 cagggaccct caactgccac tcacagtctt gccaccacta gtcattggaaa tgccaccggtt 300  
 catccaacaa gcaacagcac tgccaccagc ccaggattca ccagttctgc ccaccagaa 360  
 ccacctccac cctctccgag tcctagccca acctccaagg agaccattgg agactacacg 420  
 tggaccaatg gttcccagcc ctgtgtccac ctccaagccc agattcagat tcgagtcatt 480  
 tacacaaccc aggggtggagg agaggcctgg ggcattctctg tactgaaccc caacaaaacc 540  
 aagggtccagg gaagctgtga ggggtgccat cccacactgc ttctctcatt ccctatgga 600  
 cacctcagct ttggattcat gcaggacctc cagcagaagg ttgtctacct gagctacatg 660  
 gcggtggagt acaatgtgtc cttccccac gcagcaaagt ggacattctc ggctcagaat 720  
 gcatcccttc gagatctcca agcaccctg gggcagagct tcagttgcag caactcgagc 780  
 atcattcttt caccagctgt ccacctcgac ctgctctccc tgaggctcca ggctgctcag 840  
 ctgccccaca caggggtctt tgggcaaagt ttctctgcc ccagtgaccg gtcc 894

<210> 4  
 <211> 232

10

ES 2 379 113 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 4

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

5

<210> 5

<211> 699

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<400> 5

ES 2 379 113 T3

gagtctaagt cctgtgataa gactcatacc tgccccccct gcccagcacc cgaggcagca 60  
 gccgccccct cagtgtttct cttccctcca aaacccaagg ataccctgat gatcagccgt 120  
 acacctgagg tcacctgcgt agtcgtcgat gtgtctcacg aggacccgga ggtgaagttt 180  
 aattggtatg tggacggggg agaagtgcac aatgccaaga ctaaaccctcg agaggaacaa 240  
 tataactcca cctatagggt ggtcagcgtt ctcacgggtcc ttcaccagga ctggttgaat 300  
 ggaaaggaat acaagtgtaa ggtgagcaac aaagccctgc ccgcttccat agaaaagaca 360  
 atctccaaag ctaaagggca gccacgggaa cctcaggtgt acaccctgcc gcctagcaga 420  
 gatgagctca caaagaacca ggtgtctctg acatgcttgg tgaagggttt ctatccttcg 480  
 gacattgccg ttgagtggga aagtaacggc cagcctgaga ataactacaa gaccacacca 540  
 cccgttcttg actctgatgg gagtttcttt ttgtacagta agttaactgt cgacaaatca 600  
 cgctggcagc aaggaaatgt tttctcttgt tccgtgatgc acgaggcact gcacaacat 660  
 tacactcaga aatccctgag cctatcacca ggcaataa 699

<210> 6  
 <211> 533  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Proteína de fusión  
 <400> 6

ES 2 379 113 T3

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

ES 2 379 113 T3

Asn Val Ser Phe Pro His Ala Ala Gln Trp Thr Phe Ser Ala Gln Asn  
 225 230 235 240  
 Ala Ser Leu Arg Asp Leu Gln Ala Pro Leu Gly Gln Ser Phe Ser Cys  
 245 250 255  
 Ser Asn Ser Ser Ile Ile Leu Ser Pro Ala Val His Leu Asp Leu Leu  
 260 265 270  
 Ser Leu Arg Leu Gln Ala Ala Gln Leu Pro His Thr Gly Val Phe Gly  
 275 280 285  
 Gln Ser Phe Ser Cys Pro Ser Asp Arg Ser Gly Gly Arg Glu Ser Lys  
 290 295 300  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 325 330 335  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 340 345 350  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 355 360 365  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 370 375 380  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 385 390 395 400  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 405 410 415  
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 420 425 430  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 435 440 445  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 450 455 460  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

ES 2 379 113 T3

465					470					475					480
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
				485					490					495	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
			500					505					510		
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
		515					520					525			
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
	530														

- <210> 7
- <211> 1602
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Proteína de fusión
- <400> 7

5

aatgactgtc	ctcaca	aaaaa	atcagctact	ttgctgccat	ccttcacggt	gacacccacg	60
gttacagaga	gcactggaac	aaccagccac	aggactacca	agagccacaa	aaccaccact		120
cacaggacaa	ccaccacagg	caccaccagc	cacggacca	cgactgccac	tcacaacccc		180
accaccacca	gccatggaaa	cgtcacagtt	catccaacaa	gcaatagcac	tgccaccagc		240
cagggaccct	caactgccac	tcacagtcct	gccaccacta	gtcatggaaa	tgccacggtt		300
catccaacaa	gcaacagcac	tgccaccagc	ccaggattca	ccagttctgc	ccaccagaa		360
ccacctccac	cctctccgag	tcctagccca	acctccaagg	agaccattgg	agactacacg		420
tggaaccaatg	gttcccagcc	ctgtgtccac	ctccaagccc	agattcagat	tcgagtcatg		480
tacacaaccc	aggggtggagg	agaggcctgg	ggcatctctg	tactgaaccc	caacaaaacc		540
aaggtccagg	gaagctgtga	gggtgcccat	ccccacctgc	ttctctcatt	cccctatgga		600
cacctcagct	ttggattcat	gcaggacctc	cagcagaagg	ttgtctacct	gagctacatg		660
gcgggtggagt	acaatgtgtc	cttccccac	gcagcacagt	ggacattctc	ggctcagaat		720
gcatcccttc	gagatctcca	agcaccctg	gggcagagct	tcagttgcag	caactcgagc		780

ES 2 379 113 T3

atcattcttt caccagctgt ccacctcgac ctgctctccc tgaggctcca ggctgctcag 840  
 ctgccccaca caggggtctt tgggcaaagt ttctcctgcc ccagtgaccg gtccggcggc 900  
 cgcgagtcta agtcctgtga taagactcat acctgcccc cctgcccagc acccgaggca 960  
 gcagccgccc cctcagtgtt tctcttcctt ccaaaacca aggataccct gatgatcagc 1020  
 cgtacacctg aggtcacctg cgtagtcgtc gatgtgtctc acgaggaccg ggaggtgaag 1080  
 ttttaattggt atgtggacgg ggtagaagtg cataatgcca agactaaacc tcgagaggaa 1140  
 caatataact ccacctatag ggtggtcagc gttctcagcg tccttcacca ggactggttg 1200  
 aatggaaagg aatacaagtg taaggtgagc aacaagccc tgcccgttc catagaaaag 1260  
 acaatctcca aagctaaagg gcagccacgg gaacctcagg tgtacacctt gccgcctagc 1320  
 agagatgagc tcacaaagaa ccaggtgtct ctgacatgct tgggaaggg tttctatcct 1380  
 tcggacattg ccggtgagtg ggaaagtaac ggccagcctg agaataacta caagaccaca 1440  
 ccaccggtc ttgactctga tgggagtttc tttttgtaca gtaagttaac tgtcgacaaa 1500  
 tcacgctggc agcaaggaaa tgttttctct tgttccgtga tgcacgaggc actgcacaac 1560  
 cattacactc agaaatcctt gagcctatca ccaggcaaat aa 1602

<210> 8  
 <211> 1602  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Proteína de fusión  
 <400> 8

aatgactgtc ctcacaaaaa atcagctact ttgctgcat ccttcacggg gacaccacg 60  
 gttacagaga gcaactggaac aaccagccac aggactacca agagccacaa aaccaccact 120  
 cacaggacaa ccaccacagg caccaccagc cacggacceca cgactgccac tcacaacccc 180  
 accaccacca gccatggaaa cgtcacagtt catccaacaa gcaatagcac tgccaccagc 240  
 cagggaccct caactgccac tcacagtcct gccaccacta gtcattggaaa tgccacgggt 300  
 catccaacaa gcaacagcac tgccaccagc ccaggattca ccagttctgc ccaccagaa 360

ES 2 379 113 T3

ccacctccac	cctctccgag	tcctagccca	acctccaagg	agaccattgg	agactacacg	420
tggaccaatg	gttcccagcc	ctgtgtccac	ctccaagccc	agattcagat	tcgagtcatg	480
tacacaacc	agggtggagg	agaggcctgg	ggcatctctg	tactgaacc	caacaaaacc	540
aagggtccag	gaagctgtga	gggtgcccac	ccccacctgc	ttctctcatt	cccctatgga	600
cacctcagct	ttggattcat	gcaggacctc	cagcagaagg	ttgtctacct	gagctacatg	660
gcggtggagt	acaatgtgtc	cttccccac	gcagcaaagt	ggacattctc	ggctcagaat	720
gcatcccttc	gagatctcca	agcaccctcg	gggcagagct	tcagttgcag	caactcgagc	780
atcattcttt	caccagctgt	ccacctcgac	ctgctctccc	tgaggctcca	ggctgctcag	840
ctgccccaca	caggggtctt	tgggcaaagt	ttctcctgcc	ccagtgaccg	gtccggcggc	900
cgcgagtcta	agtctctgtga	taagactcat	acctgcccc	cctgcccagc	acccgaggca	960
gcagccgccc	cctcagtggt	tctcttcct	ccaaaacc	aggataccct	gatgatcagc	1020
cgtacacctg	aggtcacctg	cgtagtcgtc	gatgtgtctc	acgaggacc	ggaggtgaag	1080
tttaattggt	atgtggacgg	ggtagaagtg	cataatgcc	agactaaacc	tcgagaggaa	1140
caatataact	ccacctatag	ggtggtcagc	gttctcacgg	tcctcacca	ggactggttg	1200
aatgaaagg	aatacaagtg	taaggtgagc	aacaaagccc	tgcccgcttc	catagaaaag	1260
acaatctcca	aagctaaagg	gcagccacgg	gaacctcagg	tgtacaccct	gccgcctagc	1320
agagatgagc	tcacaaagaa	ccaggtgtct	ctgacatgct	tggtgaagg	tttctatcct	1380
tcggacattg	ccgttgagtg	ggaaagtaac	ggccagcctg	agaataacta	caagaccaca	1440
ccaccgcttc	ttgactctga	tgggagtttc	ttttgtaca	gtaagttaac	tgtcgacaaa	1500
tcacgctggc	agcaaggaaa	tgttttctct	tgttccgtga	tgacagaggc	actgcacaac	1560
cattacactc	agaaatccct	gagcctatca	ccaggcaaat	aa		1602

## REIVINDICACIONES

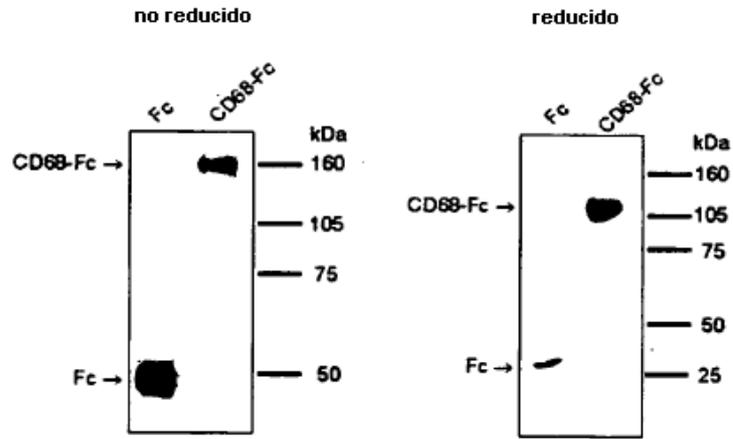
1. Proteína de fusión que presenta:
- (a) un primer polipéptido que se une específicamente a LDL oxidada (oxLDL), y
  - (b) un segundo polipéptido que media una dimerización,
- 5 **caracterizada porque** el primer polipéptido presenta un segmento o una variante de secuencia de CD68, que presentan respectivamente la función de unión a LDL de CD68.
2. Proteína de fusión según la reivindicación 1, **caracterizada porque** el primer polipéptido presenta CD68, preferentemente presenta el dominio extracelular de CD68 o un fragmento o una variante del mismo que presentan respectivamente la función de unión a LDL de CD68.
- 10 3. Proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada porque** el segundo polipéptido presenta un dominio Fc de una inmunoglobulina o un fragmento o una variante del mismo que presentan respectivamente la función de dimerización del dominio Fc.
4. Proteína de fusión según la reivindicación 3, **caracterizada porque** la variante del dominio Fc presenta una mutación en la región de unión al complemento y al receptor de Fc tal que reduce la inmunogenicidad de la proteína de fusión.
- 15 5. Proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** la proteína de fusión presenta además un elemento que conecta el primer polipéptido con el segundo polipéptido.
6. Proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** el primer polipéptido presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1 del protocolo de secuencias adjunto.
- 20 7. Proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** el primer polipéptido es codificado por una molécula de ácido nucleico, que presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 2 ó 3 del protocolo de secuencias adjunto, o variantes de la misma, que debido a la degeneración del código genético codifican para el mismo polipéptido.
- 25 8. Proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** el segundo polipéptido presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 4 del protocolo de secuencias adjunto.
9. Proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** el segundo polipéptido es codificado por una molécula de ácido nucleico que presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 5 del protocolo de secuencias adjunto, o una variante de la misma, que debido a la degeneración del código genético codifica para el mismo polipéptido.
- 30 10. Proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 6 del protocolo de secuencias adjunto.
11. Proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada porque** es codificada por una molécula de ácido nucleico que presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 7 u 8 del protocolo de secuencias adjunto, o variantes de la misma, que debido a la degeneración del código genético codifican para la misma proteína de fusión.
- 35 12. Proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada porque** la proteína de fusión presenta además un marcador detectable.
13. Homodímero que presenta la proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 12.
- 40 15. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 14, que presenta:
- (a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que se une específicamente a oxLDL, y
  - (b) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que media una dimerización,
- caracterizada porque** el primer polipéptido presenta la función de unión a LDL de CD68.
- 45 16. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 14 ó 15, **caracterizada porque** presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 2 ó 3, del protocolo de secuencias adjunto, o variantes de la misma, que debido a la degeneración del código genético codifican para el mismo polipéptido.
17. Molécula de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 14 a 16, **caracterizada porque** presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 5 del protocolo de secuencias adjunto, o una variante de la misma, que debido

a la degeneración del código genético codifica para el mismo polipéptido.

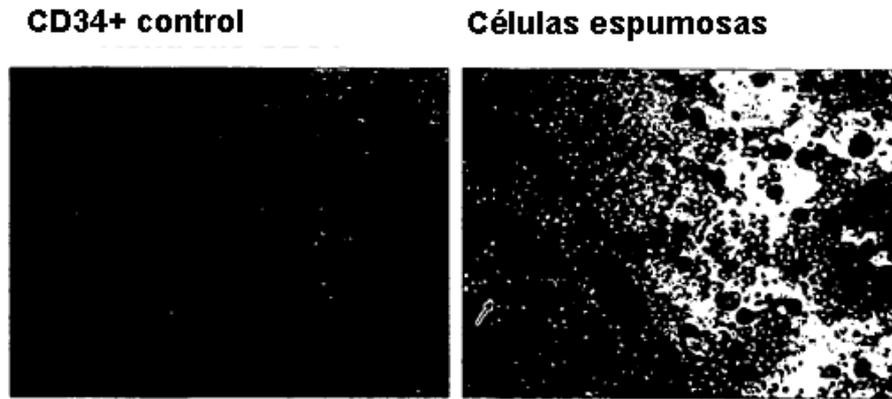
18. Molécula de ácido nucleico, según una de las reivindicaciones 14 a 17, **caracterizada porque** presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 7 u 8 del protocolo de secuencias adjunto, o variantes de la misma, que debido a la degeneración del código genético codifican para el mismo polipéptido.

- 5 19. Composición farmacéutica y/o de diagnóstico que presenta la proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 12 y/o el homodímero según la reivindicación 13 y/o la molécula de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 14 a 18 y dado el caso un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico y/o de diagnóstico así como dado el caso aditivos activos desde el punto de vista farmacéutico y/o de diagnóstico adicionales.
- 10 20. Uso de la proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 12 y/o del homodímero según la reivindicación 13 y/o de la molécula de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 14 a 18 para la producción de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico para el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades vasculares agudas o crónicas, incluyendo aterosclerosis y placas ateroscleróticas.
- 15 21. Procedimiento para la producción de la proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 12, que presenta las siguientes etapas:
- (1) proporcionar una primera secuencia de nucleótidos que codifique para un polipéptido que se une específicamente a oxLDL, que presenta la función de unión a LDL de CD68,
  - (2) proporcionar una segunda secuencia de nucleótidos que codifique para un polipéptido que media una dimerización,
  - 20 (3) ligar la primera y la segunda secuencia de nucleótidos para obtener una secuencia de fusión que codifique para la proteína de fusión,
  - (4) clonar la secuencia de fusión en un vector de expresión,
  - (5) introducir el vector de expresión en una célula adecuada para la expresión,
  - (6) expresar la proteína de fusión en la célula, y
  - 25 (7) aislar la proteína de fusión a partir de la célula.

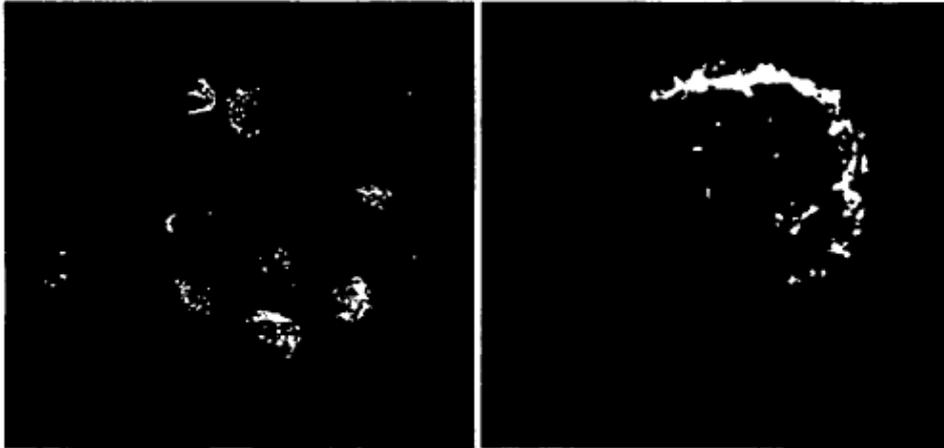
**Figura 1**



**Figura 2 A**



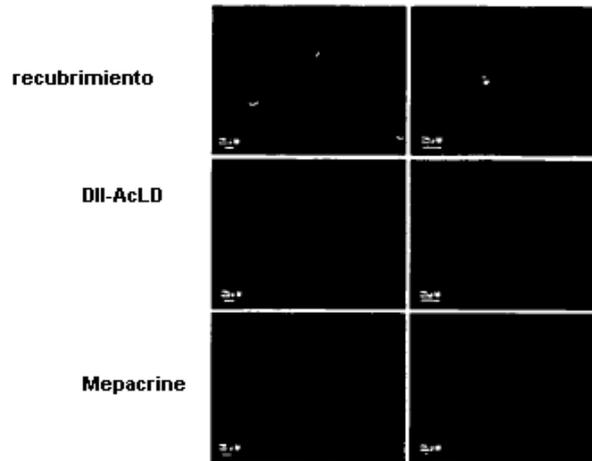
**Figura 2B**



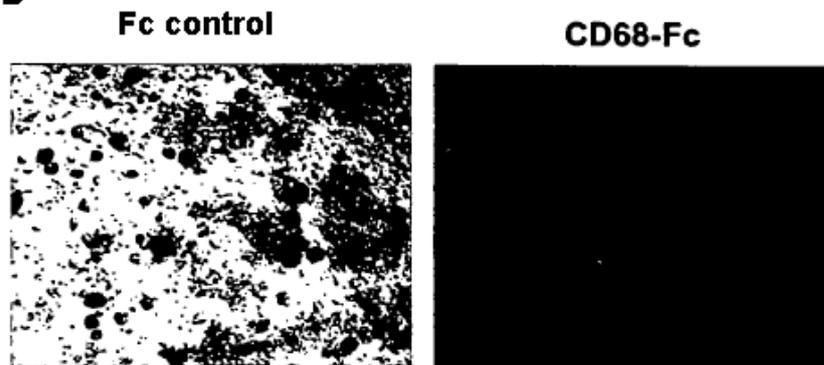
**Figura 2C**



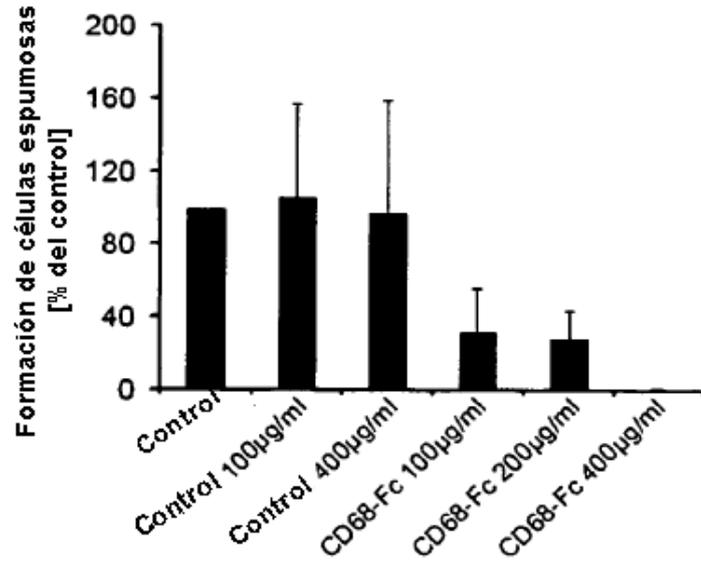
**Figura 3A**



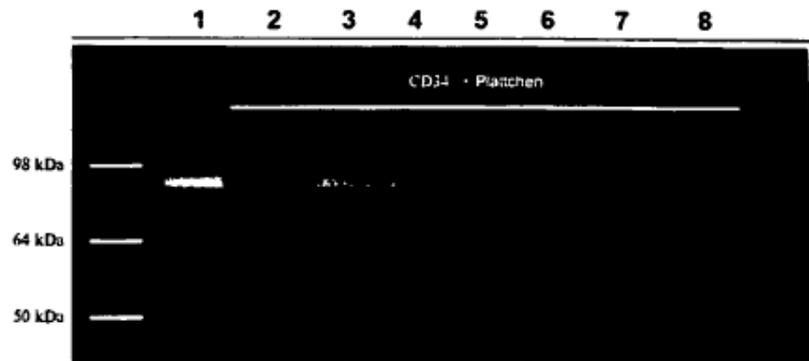
**Figura 3B**



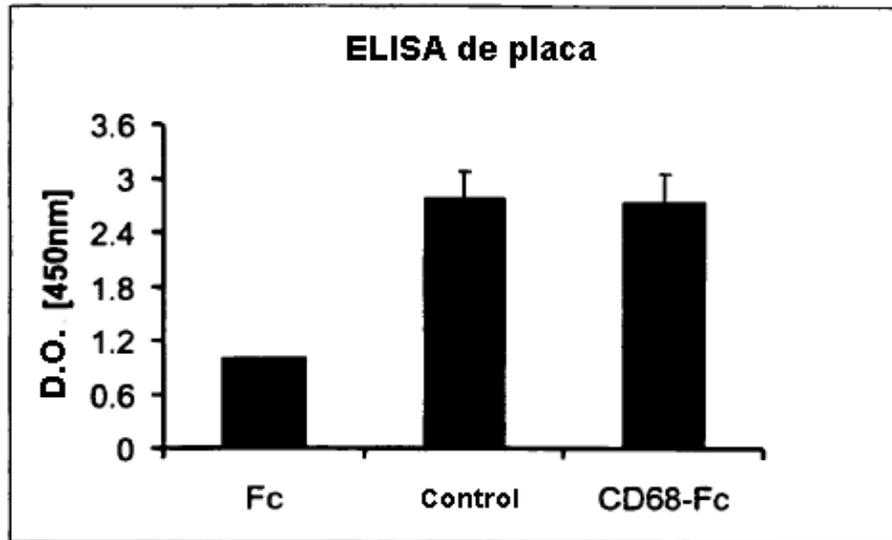
**Figura 3C**



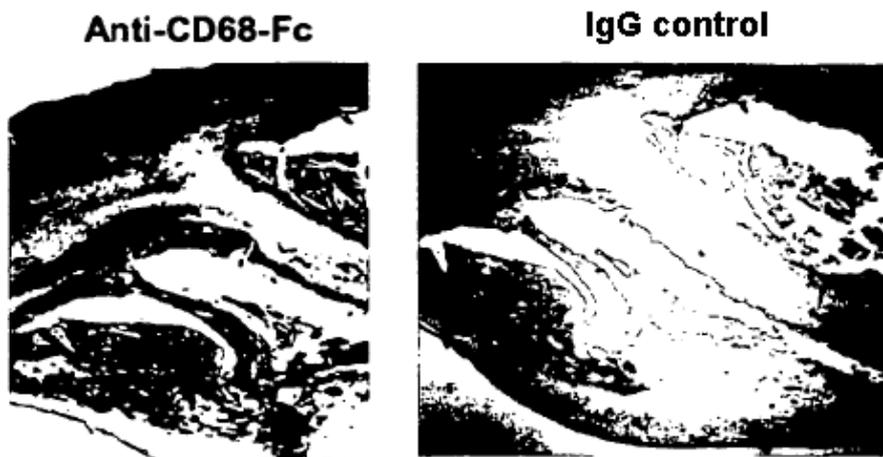
**Figura 4**



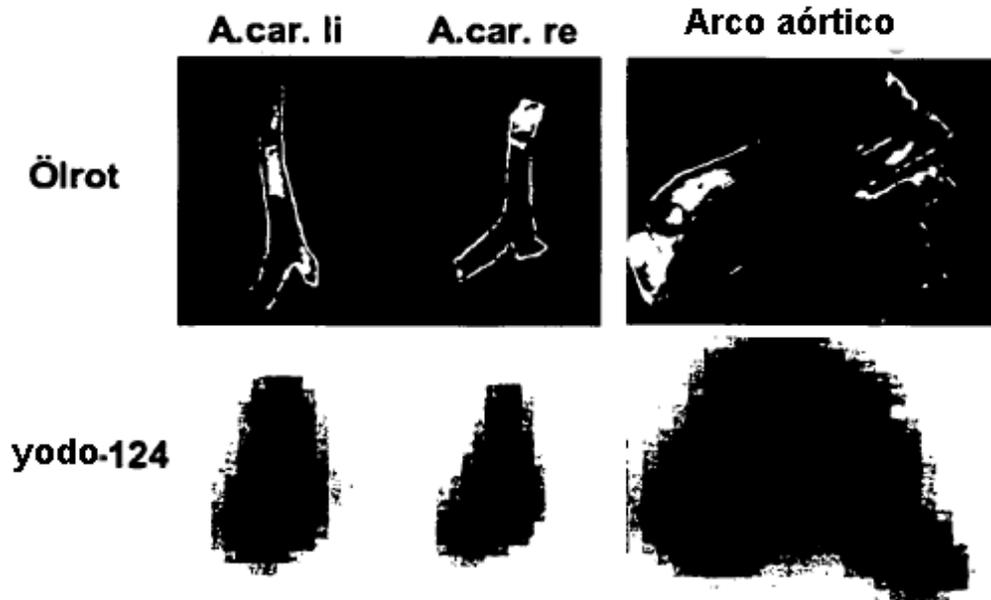
**Figura 5A**



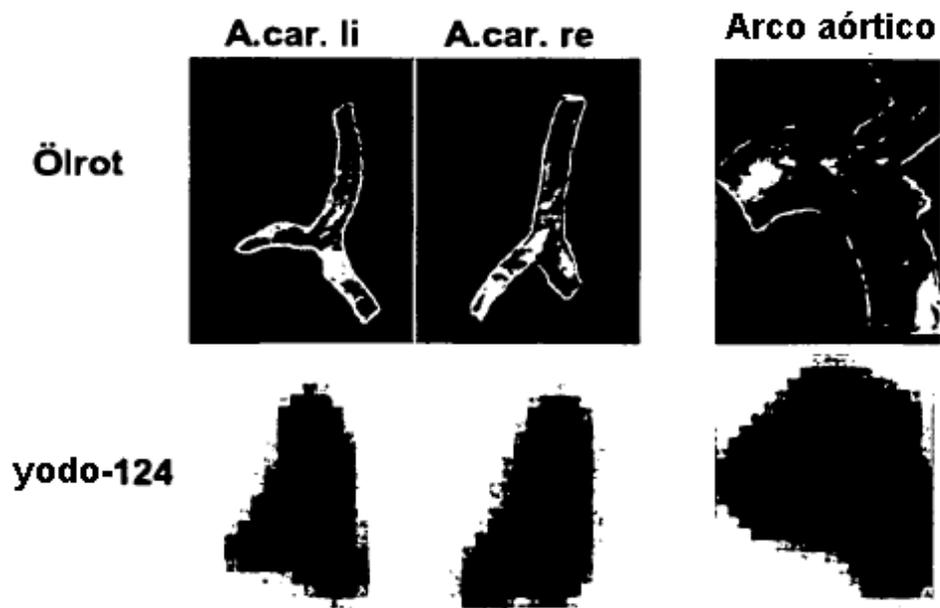
**Figura 5B**



**Figura 6A**



**Figura 6B**



**Figura 6C**

