

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 993**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2009 E 09747827 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2352509**

54 Título: **Proteínas HLA-G y usos farmacéuticos de las mismas**

30 Prioridad:

07.11.2008 EP 08168675
10.11.2008 US 112804 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2013

73 Titular/es:

HLA-G TECHNOLOGIES (50.0%)
40/41 Quai Fulchiron
69005 Lyon, FR y
COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (50.0%)

72 Inventor/es:

FAVIER, BENOIT;
CARSELLA, EDGARDO D. y
LEMAOULT, JOËL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 423 993 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

Proteínas HLA-G y usos farmacéuticos de las mismas

5 La presente invención se refiere a proteínas nuevas y a los usos farmacéuticos de las mismas. La invención se refiere de manera más específica a proteínas de fusión nuevas que comprenden un dominio de un antígeno HLA-G fusionado a un dominio Fc de una inmunoglobulina. La invención se refiere además a métodos para producir tales polipéptidos, a las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, así como a sus usos para tratar diversas enfermedades que incluyen el rechazo de órganos/tejidos.

Antecedentes

10 Los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se dividen en tres clases principales, concretamente los antígenos de clase I, antígenos de clase II (HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR), y antígenos de clase III.

Los antígenos de clase I comprenden los antígenos convencionales, HLA-A, HLA-B y HLA-C, que exhiben 3 dominios globulares ([alfa]1, [alfa]2 y [alfa]3), así como los antígenos no convencionales HLA-E, HLA-F, y HLA-G.

15 HLA-G es una molécula de Clase I de HLA no clásica expresada por los trofoblastos extravelosos de placenta humana normal y las células epiteliales del timo. Los antígenos HLA-G se expresan básicamente en las células citotrofoblásticas de la placenta, y funcionan como agentes inmunomoduladores que protegen al feto del sistema inmunitario materno (ausencia de rechazo por parte de la madre). Se ha descrito la secuencia del gen de HLA-G (p.ej., Geraghty et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149; Ellis; et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735), y comprende 4396 pares de bases. Este gen está compuesto de 8 exones, 7 intrones y un extremo 3' sin traducir, que corresponden respectivamente a los dominios siguientes: exón 1: secuencia señal, exón 2: dominio extracelular alfa1, exón 3: dominio extracelular alfa2, exón 4: dominio extracelular alfa3, exón 5: región transmembrana, exón 6: dominio citoplasmático I, exón 7: dominio citoplasmático II (sin traducir), exón 8: dominio citoplasmático III (sin traducir) y región de 3' sin traducir. Se han identificado siete isoformas de HLA-G, de las cuales 4 están asociadas a membranas (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 y HLA-G4) y 3 son solubles (HLA-G5, HLA-G6 y HLA-G7) (véase, p.ej., Carosella et al., Blood 2008, vol. 111, pág. 4862).

20

25

La isoforma de la proteína HLA-G1 madura comprende los tres dominios externos (α 1- α 3), la región transmembrana y el dominio citoplasmático.

La isoforma de la proteína HLA-G2 no comprende el dominio α 2, es decir, los dominios α 1 y α 3 están unidos directamente, seguidos por el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático.

30 La isoforma de la proteína HLA-G3 carece de ambos dominios α 2 y α 3, es decir, comprende el dominio α 1 unido directamente al dominio transmembrana y al dominio citoplasmático. La isoforma de la proteína HLA-G4 carece del dominio α 3, es decir, comprende el dominio α 1, el dominio α 2, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático.

35 Todas las isoformas de HLA-G solubles carecen de los dominios transmembrana y citoplasmáticos. Más específicamente:

La isoforma de la proteína HLA-G5 contiene los dominios α 1, α 2 y α 3, así como una secuencia peptídica C-terminal extra de 21 residuos de aminoácidos codificada por el intrón 4 (como resultado de la retención del intrón 4 tras el corte y empalme del transcrito y la maduración del ARN).

40 La isoforma de la proteína HLA-G6 corresponde al HLA-G5 sin α 2, es decir, HLA-G6 contiene los dominios α 1 y α 3, así como una secuencia peptídica C-terminal extra de 21 residuos de aminoácidos codificada por el intrón 4 (como resultado de la retención del intrón 4 tras el corte y empalme del transcrito y la maduración del ARN).

La isoforma de la proteína HLA-G7 contiene solamente el dominio alfa1, así como 2 residuos de aminoácidos C-terminales adicionales codificados por el intrón 2 (como resultado de la retención del intrón 2 tras el corte y empalme del transcrito y la maduración del ARN).

45 Todas estas isoformas se han descrito, p.ej., en Kirszenbaum M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 4209-4213; la solicitud europea EP 0 677 582; Kirszenbaum M. et al., Human Immunol., 1995, 43, 237-241; Moreau P. et al., Human Immunol., 1995, 43, 231-236).

50 Los estudios previos han demostrado que las proteínas HLA-G son capaces de inhibir las respuestas alógenas, tales como la respuesta proliferativa de linfocitos T, la citólisis mediada por linfocitos T citotóxicos, y la citólisis mediada por células NK (Rouas-Freiss N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1997, 94, 5249-5254; Semin Cancer Biol 1999, vol 9, pág. 3). Como resultado, las proteínas HLA-G se han propuesto para tratar el rechazo de injertos en el trasplante alógeno o xenogénico de órganos/tejidos. Las proteínas HLA-G también se han propuesto para tratar cánceres (documento EP1 054 688), trastornos inflamatorios (documento EP1 189 627) y, más en general, enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario. También se ha propuesto fusionar proteínas HLA-G a

ligandos específicos para dirigir HLA-G hacia células o tejidos particulares (documento WO2007091078). Se debería indicar, sin embargo, que no se han proporcionado resultados o datos experimentales que demuestren que tales fusiones de selección del objetivo son activas.

5 Las isoformas de HLA-G parecen adoptar una conformación de dímero como resultado de la formación de un puente disulfuro intermolecular entre el residuo de cisteína 42 de los dominios $\alpha 1$ de dos moléculas de HLA-G (Apps et al., Eur. J. Immunol. 2007, vol. 37 pág. 1924; documento WO2007/011044). Se ha propuesto que los sitios de unión al receptor de los dímeros de HLA-G son más accesibles que los de los monómeros correspondientes, de forma que los dímeros tendrían una afinidad mayor y una velocidad de disociación menor que los monómeros. Sin embargo, no está claro qué conformación es la más activa para fines farmacéuticos, en especial con relación a las formas solubles de HLA-G, ni cómo se pueden producir dímeros u oligómeros de HLA-G adecuados.

Compendio de la invención

15 La presente invención se refiere a proteínas o polipéptidos nuevos, a las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, y a los usos de los mismos. De manera más específica, la presente invención se refiere a polipéptidos de fusión nuevos que comprenden una secuencia derivada de HLA-G y una secuencia derivada de un fragmento Fc de inmunoglobulina como se define en la Reivindicación 1. Estos polipéptidos son capaces de formar complejos diméricos funcionalmente activos, y son capaces de inhibir de manera eficaz el rechazo de órganos in vivo. Estos polipéptidos representan así candidatos a fármacos para tratar tales trastornos, así como otras enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario.

20 Un objetivo de la presente invención reside así en un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende la secuencia de un dominio de un antígeno HLA-G, unido a un segundo polipéptido que comprende la secuencia de un dominio Fc de una inmunoglobulina y que carece de un sitio de unión al antígeno funcional de la inmunoglobulina.

25 Como se describirá, el dominio de HLA-G contenido en el polipéptido de fusión puede comprender todo o parte de la porción extracelular de un antígeno HLA-G, en general todo o una parte funcional de los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y/o $\alpha 3$ de HLA-G. En una realización específica, el dominio Fc comprende una secuencia que es suficiente para permitir la formación de un dímero (homodímero o heterodímero) entre dos polipéptidos de fusión de esta invención y/o no contiene un dominio específico de epítipo/antígeno de la inmunoglobulina.

En una realización particular, el polipéptido de fusión de la invención comprende además un tercer dominio polipeptídico que comprende la secuencia de una $\beta 2$ microglobulina.

30 Otro objetivo de esta invención es una forma premadura de un polipéptido como se describió anteriormente, que comprende además una secuencia de péptido señal que provoca la secreción.

Un objetivo adicional de esta invención reside en una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión como se describió anteriormente.

35 La invención también se refiere a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente.

Otro objetivo de esta invención es una célula hospedadora recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector como se definió anteriormente.

40 Un objetivo adicional de esta invención es un método para producir un polipéptido como se definió anteriormente, que comprende cultivar una célula hospedadora recombinante de la invención en condiciones que permiten la expresión de la molécula de ácido nucleico, y recuperar el polipéptido producido.

La invención se refiere además a un dímero (p.ej., un homodímero o un heterodímero) de un polipéptido de la invención.

La invención también se refiere a un anticuerpo que se une de manera específica a un polipéptido de fusión de esta invención o a un dímero del mismo.

45 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se definió anteriormente, en forma de un monómero o de un multímero.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido como se definió anteriormente, o a una célula recombinante que expresa tal polipéptido.

50 La invención se refiere además a tales polipéptidos o composiciones farmacéuticas para tratar el rechazo de órganos o tejidos, enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunitarias.

Un objetivo adicional de esta invención también se refiere a proporcionar un método para tratar el rechazo de órganos/tejidos, y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un polipéptido o composición de esta invención. De manera más específica, el método comprende administrar el polipéptido o la composición al sujeto, antes, durante y/o después de un trasplante de tejidos/órganos.

- 5 Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar un método para promover la tolerancia hacia un injerto en un sujeto, y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un polipéptido o composición como se definió anteriormente.

La invención se puede usar en cualquier sujeto mamífero, preferiblemente en sujetos humanos. Como se describirá adicionalmente más adelante, los polipéptidos de esta invención son capaces de inhibir sustancialmente el rechazo de tejidos in vivo tras un trasplante.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Las proteínas de fusión HLA-G-Fc pueden formar dímeros.

Figura 2: Las proteínas de fusión HLA-G-Fc inducen la señalización por medio del receptor ILT2.

Figura 3: HLA-G6-Fc promueve la supervivencia de injertos in vivo.

- 15 Figura 4: HLA-G1-B2M-Fc promueve la supervivencia de injertos in vivo.

Figura 5: HLA-Ga1-Fc promueve la supervivencia de injertos in vivo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos de fusión que comprenden un antígeno HLA-G o una porción del mismo. Los polipéptidos de fusión de esta invención pueden formar dímeros biológicamente activos, y se ha demostrado que inhiben de manera eficaz el rechazo de injertos in vivo. De manera más específica, los inventores han descubierto que, fusionando tal antígeno HLA-G a un dominio Fc de una inmunoglobulina, se pueden generar proteínas biológicamente activas, que tienen la capacidad de inducir una tolerancia inmunitaria intensa y pueden adoptar una conformación biológicamente activa in vivo. Estos resultados son sorprendentes debido a que los dominios HLA-G nunca se habían fusionado a tales restos formadores de dímeros, y debido a que la posición espacial de los dominios de HLA-G en tales dímeros difiere de la de los complejos de HLA-G que se dan de manera natural. Los resultados obtenidos demuestran que los polipéptidos de fusión de esta invención exhiben una actividad inmunorreguladora elevada in vivo, y por lo tanto representan medicamentos nuevos para tratar trastornos relacionados con el sistema inmunitario, en particular para reducir respuestas inmunitarias indeseables o perjudiciales en un sujeto.

- 30 Un primer objetivo de la presente invención reside así en un polipéptido de fusión que comprende:

- un primer polipéptido que comprende la secuencia de un dominio de un antígeno HLA-G, unido a
- un segundo polipéptido que comprende la secuencia de un dominio Fc de una inmunoglobulina y que carece de un sitio de unión al antígeno funcional de la inmunoglobulina.

En el contexto de la presente invención, los términos "polipéptido" y "proteína" designan, de manera intercambiable, una molécula que comprende un polímero de residuos de aminoácidos, que pueden estar unidos entre sí por medio de una unión peptídica, o por medio de uniones peptidomiméticas modificadas. Los residuos de aminoácidos de dichas proteínas o polipéptidos pueden ser residuos de aminoácidos naturales, o residuos de aminoácidos no naturales o modificados. Pueden estar en una conformación L y/o D. Además, el polipéptido o proteína puede estar protegido y/o modificado en posición terminal, p.ej., por medio de una alteración química o física de las funciones laterales, por ejemplo.

En un polipéptido de fusión de esta invención, los diversos dominios polipeptídicos están unidos de manera covalente entre sí de forma que se producen, lo más preferiblemente, como una única molécula por medio de técnicas recombinantes.

45 Son posibles diversas disposiciones en las proteínas de fusión de esta invención. En particular, los diversos dominios pueden estar colocados en posición C-ter o N-ter, y unidos entre sí directamente o por medio de grupos espaciadores. En una realización muy preferida, el primer polipéptido (es decir, la secuencia derivada de HLA-G) se localiza en posición N-ter del segundo polipéptido (la secuencia derivada de Fc), que se localiza en posición C-ter del polipéptido de fusión. Como se muestra en los ejemplos, tal conformación permite la dimerización del polipéptido y una actividad biológica eficaz in vivo.

50 El acoplamiento entre los diversos dominios polipeptídicos puede ser directo, es decir, sin ninguna secuencia intermedia (aunque puede haber residuos de aminoácidos intermedios para fines de acoplamiento/clonación o como resultado de etapas de clonación, p.ej., que corresponden a sitio(s) de restricción), o indirecto, es decir, con una

secuencia intermedia (grupo espaciador). En este último caso, el grupo espaciador puede tener una longitud variable, en general entre 4 y 20 residuos de aminoácidos, y preferiblemente debería ser biológicamente inerte. Un ejemplo de tal grupo espaciador es el motivo (G4S)_n, en el que n es un número entero de 1 a 4.

5 En una realización preferida de un polipéptido de fusión de esta invención, el primer y segundo polipéptidos están unidos directamente. De manera más precisa, el residuo C-terminal de la secuencia derivada de HLA-G está unido al residuo N-terminal de la secuencia derivada de Fc.

10 El dominio de HLA-G contenido en el polipéptido de fusión puede comprender todo o parte de la porción extracelular de un antígeno HLA-G, en general todo o una parte funcional de los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y/o $\alpha 3$ de un antígeno HLA-G. La secuencia de aminoácidos de HLA-G1 se ha descrito, p.ej., en Geraghty et al.; Ellis; et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735, citados anteriormente. Las secuencias de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ pueden derivar directamente de dichas publicaciones. Estas secuencias también están disponibles a través de Internet (véanse, por ejemplo, los números de Genbank para HLA-G: primera clonación de la secuencia genómica: Geraghty et al, PNAS 1987: PubMed ID: 3480534, GeneID: 3135; Primera clonación del cADN de HLA-G1: Ellis et al, Journal of Immunology 1990. PubMed ID: 2295808). Además, las secuencias de HLA-G5, HLA-G6 y HLA-G7 también están disponibles a partir de los documentos US 5.856.442, US 6.291.659, FR 2.810.047, o Paul et al., Hum. Immunol 2000; 61: 1138).

15 Como se indicó, los polipéptidos de fusión de esta invención comprenden al menos una porción de un dominio extracelular de un antígeno HLA-G. En una realización preferida, el antígeno HLA-G es un antígeno HLA-G humano.

20 En una realización particular, el polipéptido de fusión de esta invención comprende al menos la secuencia de aminoácidos del dominio $\alpha 1$ de un antígeno HLA-G humano.

Según otras realizaciones específicas, el primer polipéptido de los polipéptidos de fusión de esta invención se selecciona de:

- la secuencia de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un antígeno HLA-G;
- la secuencia de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$ de un antígeno HLA-G;
- 25 - la secuencia de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un antígeno HLA-G;
- la secuencia de aminoácidos de HLA-G5;
- la secuencia de aminoácidos de HLA-G6; o
- la secuencia de aminoácidos de HLA-G7.

30 Un ejemplo específico de la secuencia de aminoácidos de un dominio $\alpha 1$ de HLA-G humano se proporciona en SEQ ID N°: 6 (residuos de aminoácidos 21 a 110). Un ejemplo específico de la secuencia de aminoácidos de HLA-G6 humano se proporciona en SEQ ID N°: 2 (residuos de aminoácidos 25 a 227). Un ejemplo específico de la secuencia de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un HLA-G humano se proporciona en SEQ ID N°: 4 (residuos de aminoácidos 135-412). Se debería entender que existen variantes naturales de los antígenos HLA-G, p.ej. como resultado del polimorfismo, que se incluyen en la presente solicitud. Además, las variantes de las secuencias anteriores que carecen de ciertos residuos de aminoácidos (p.ej., entre 1 y 10, preferiblemente entre 1-5, lo más preferiblemente 1, 2, 3, 4 ó 5), y/o que contienen ciertas sustituciones o inserciones de aminoácidos (p.ej., entre 1 y 10, preferiblemente entre 1-5, lo más preferiblemente 1, 2, 3, 4 ó 5) se incluyen también en la presente invención.

40 El segundo dominio polipeptídico de los polipéptidos de fusión de esta invención comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de una inmunoglobulina. La región Fc de una inmunoglobulina comprende en general los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada, así como la región de la bisagra. El dominio Fc comprende preferiblemente una secuencia que es suficiente para permitir la formación de un dímero (homodímero o heterodímero) entre dos polipéptidos de fusión de esta invención. El dominio Fc puede derivar de una inmunoglobulina de origen humano o animal, tal como, sin limitación, roedor, equino o primate. El segundo polipéptido no comprende un dominio específico del epítopo/antígeno de dicha inmunoglobulina. El segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de una inmunoglobulina y carece de un sitio de unión al antígeno funcional de la inmunoglobulina.

45 El dominio Fc puede derivar de una inmunoglobulina de diversos serotipos, tal como de una IgG, una IgA, una IgM, una IgD o una IgE. La secuencia del dominio Fc deriva preferiblemente de una IgG. Los ejemplos de tales secuencias de dominios Fc se proporcionan en la presente solicitud. En particular, se proporciona un ejemplo específico del dominio Fc de una IgG humana en SEQ ID N°: 2 (residuos de aminoácidos 235 a 452). Se proporciona un ejemplo específico del dominio Fc de una IgG murina en SEQ ID N°: 6 (residuos de aminoácidos 120 a FIN). Se debería entender que las variaciones de secuencias se pueden tolerar en la secuencia del dominio Fc, con tal de que la secuencia resultante conserve la capacidad de formar dímeros. La secuencia de un dominio Fc de una inmunoglobulina se puede obtener de la secuencia de cualquier inmunoglobulina conocida según métodos

conocidos en la técnica. Se debería entender que la secuencia de los dominios Fc se puede obtener también a partir de bases de datos, y se puede analizar su capacidad de dimerizar in vitro.

5 Una realización particular de esta invención se refiere así a un polipéptido de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido unidos entre sí por medio de una unión peptídica, en el que el primer polipéptido se localiza en posición N-ter del segundo polipéptido, que se localiza en posición C-ter del polipéptido de fusión, y en el que el primer polipéptido comprende al menos la secuencia de un dominio $\alpha 1$ de un antígeno HLA-G y el segundo polipéptido comprende la secuencia de un dominio Fc de una inmunoglobulina.

Los ejemplos específicos de tales polipéptidos de fusión de la invención son:

- HLA-G $\alpha 1$ -Fc de SEQ ID N°: 6 (o los residuos 21-351 del mismo), y
- 10 - HLA-G6-Fc de SEQ ID N°: 2 (o los residuos 25-452 del mismo).

En HLA-G $\alpha 1$ -Fc, el dominio $\alpha 1$ de HLA-G está fusionado directamente al dominio Fc de una IgG2a de ratón. Los residuos de aminoácidos intermedios 111 a 119 están presentes entre los dos dominios. Los residuos de aminoácidos 1-20 corresponden a la secuencia del péptido señal de la proteína interleucina-2. HLA-G $\alpha 1$ -Fc, en la forma madura, por lo tanto, comprende los residuos de aminoácidos 21-351 de SEQ ID N°: 6.

15 En HLA-G6-Fc, la secuencia de HLA-G6 esta fusionada directamente al dominio Fc de una IgG2 humana. Los residuos de aminoácidos intermedios 228-234 están presentes entre los dos dominios. Los residuos de aminoácidos 1-24 corresponden a la secuencia del péptido señal de HLA-G. HLA-G6-Fc, en la forma madura, por lo tanto, comprende los residuos de aminoácidos 25-452 de SEQ ID N°: 2.

20 Como se menciona en los ejemplos, estos dos polipéptidos son capaces de promover la tolerancia a injertos in vivo. En particular, HLA-G $\alpha 1$ -Fc, que comprende solamente el dominio $\alpha 1$ de HLA-G, fue inesperadamente el más eficaz para retrasar el rechazo de injertos in vivo.

25 Como se discutió anteriormente, los polipéptidos de fusión de esta invención pueden comprender dominio(s) funcional(es) adicional(es). A este respecto, en una realización particular, los polipéptidos de fusión de esta invención comprenden un tercer dominio polipeptídico que comprende la secuencia de una $\beta 2$ microglobulina. Se sabe que la isoforma HLA-G1 de HLA-G forma un complejo con $\beta 2$ microglobulina en la superficie celular. Para imitar este complejo, la invención propone incluir, en los polipéptidos de fusión, una secuencia de la $\beta 2$ microglobulina, dispuesta de tal manera que permita la formación de un complejo biológicamente activo. Cuando está presente, la secuencia polipeptídica de la $\beta 2$ microglobulina está localizada lo más preferiblemente en la parte N-terminal del polipéptido de fusión, y está unida a la primera secuencia polipeptídica, según el esquema siguiente:

30 secuencia de B2M - secuencia de HLA-G - dominio Fc

Además, en una realización muy preferida, la secuencia de B2M está unida a la secuencia de HLA-G por medio de un grupo espaciador, que permite el replegamiento adecuado del polipéptido. Lo más preferiblemente, el grupo espaciador comprende de 8 a 20 residuos de aminoácidos, más preferiblemente de 8 a 15, aún más preferiblemente de 8 a 12. En una realización específica, el grupo espaciador tiene la secuencia (G4S)_n, en la que n es 2 ó 3.

35 Un ejemplo específico de tal polipéptido de fusión de esta invención es:

- HLA-G1-B2M-Fc de SEQ ID N°: 4 (o los residuos 21-656 del mismo).

40 En HLA-G1-B2M-Fc, la secuencia B2M está fusionada a los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-G1 por medio de un ligador peptídico (residuos 120-134), y el dominio de HLA-G1 está unido a la secuencia Fc de una IgG2 humana. Los residuos de aminoácidos 1-20 corresponden a la secuencia del péptido señal de B2M. HLA-G1-B2M-Fc, en la forma madura, por lo tanto, comprende los residuos de aminoácidos 21-656 de SEQ ID N°: 4.

Un objetivo adicional de esta invención es un dímero de un polipéptido como se definió anteriormente. El dímero puede ser un homodímero, p.ej., entre dos polipéptidos de fusión idénticos, o un heterodímero, p.ej., entre dos polipéptidos de fusión distintos que comprenden un dominio Fc.

45 Los polipéptidos de fusión de esta invención se pueden obtener mediante el uso de métodos conocidos por sí mismos en la técnica, tales como síntesis artificial, técnicas recombinantes, y/o combinaciones de las mismas. En una realización típica, como se ilustra en los ejemplos, los dominios se producen mediante técnicas recombinantes, preferiblemente directamente en forma de un polipéptido de fusión, partiendo de un polinucleótido codificante químico.

50 A este respecto, un objetivo adicional de esta invención es una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión como se definió anteriormente. El ácido nucleico puede ser, p.ej., ARN o ADN, monocatenario o bicatenario. Se puede producir mediante métodos conocidos por sí mismos en la técnica, tales como ingeniería genética, síntesis química o enzimática, etc. En una realización particular, el ácido nucleico comprende además una secuencia que codifica un péptido líder para la secreción, unido de forma operable a la secuencia que codifica el

polipéptido de fusión. Como resultado, la expresión de tal ácido nucleico conduce a la secreción del polipéptido de fusión por la célula hospedadora seleccionada. El péptido líder puede ser de origen diverso, tal como de genes humanos o mamíferos, p.ej., B2M, interleucina, HLA-, etc. Los ejemplos específicos de ácidos nucleicos de esta invención son moléculas de ácido nucleico que comprenden SEQ ID N°: 1, 3, o 5.

5 Un objetivo adicional de esta invención reside también en un vector que comprende un ácido nucleico como se definió anteriormente. El vector puede ser un vector de clonación y/o de expresión, tal como un plásmido, cósmido, fago, un vector viral, un cromosoma artificial, etc. Los ejemplos específicos de tales vectores incluyen plásmidos pFUSE, plásmidos pUC, plásmidos pcDNA, plásmidos pBR, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores baculovirales, vectores de fago lambda, etc. El vector puede comprender secuencias reguladoras, tales como un
10 promotor, un terminador, un origen de replicación, etc. El vector se puede usar para producir polipéptidos de esta invención in vitro, mediante técnicas recombinantes, o directamente in vivo, en aproximaciones de terapia génica.

Un objetivo adicional de esta invención es una célula hospedadora recombinante que comprende un ácido nucleico o un vector como se definió anteriormente. La célula hospedadora puede ser procariótica o eucariótica. Los ejemplos de hospedadores procarióticos incluyen cualquier bacteria, tal como E. coli. Los ejemplos de células eucarióticas
15 incluyen levaduras, hongos, células de mamífero, células vegetales o células de insecto. Las células recombinantes de esta invención se pueden preparar mediante métodos de transformación conocidos por sí mismos en la técnica, tales como transfección, lipofección, electroporación, transformación de protoplastos, etc. Estas células se pueden mantener y cultivar en cualquier medio de cultivo adecuado.

Las células recombinantes de esta invención se pueden usar, p.ej., para producir polipéptidos de esta invención in vitro o ex vivo, o como productos de terapia celular, para producir los polipéptidos in vivo.
20

A este respecto, un objetivo de esta invención reside también en un método para producir un polipéptido como se describió anteriormente, y el método comprende cultivar una célula hospedadora recombinante de la invención en condiciones que permiten la expresión de la molécula de ácido nucleico, y recuperar el polipéptido producido. El polipéptido se puede recuperar y/o purificar mediante el uso de métodos conocidos por sí mismos en la técnica, tales como centrifugación, filtración, técnicas cromatográficas, etc.
25

Tras la producción, los polipéptidos de esta invención se pueden modificar para mejorar sus propiedades, por ejemplo para mejorar sus propiedades farmacocinéticas. A este respecto, se pueden modificar para incrementar su estabilidad o resistencia a proteasas, tal como añadiendo grupos protectores terminales (p.ej., amida, éster). También se pueden revestir en un soporte portador para incrementar la densidad del polipéptido.

30 Un objetivo adicional de esta invención es una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se definió anteriormente y, preferiblemente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un objetivo adicional de esta invención es una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico como se definió anteriormente y, preferiblemente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un objetivo adicional de esta invención es una composición farmacéutica que comprende una célula recombinante como se definió anteriormente y, preferiblemente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
35

Los excipientes o vehículos adecuados incluyen cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable tal como agentes tamponadores, agentes estabilizantes, diluyentes, sales, conservantes, agentes emulsionantes, edulcorantes, etc. El excipiente comprende en general una disolución acuosa o no acuosa isotónica, que se puede preparar según técnicas conocidas. Las disoluciones adecuadas incluyen solutos tamponados, tales como disolución tamponada de fosfato, disoluciones de cloruro, disolución de Ringer, y similares. La preparación farmacéutica está en general en forma de una composición inyectable, preferiblemente una composición inyectable líquida, aunque también se pueden considerar otras formas, tales como comprimidos, cápsulas, jarabes, etc. Las composiciones de esta invención se pueden administrar por varias vías diferentes, tales como por vía sistémica, parenteral, oral, rectal, nasal o vaginal. Se administran preferiblemente mediante inyección, tal como inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea. También se considera la administración transdérmica. El técnico experto puede ajustar la dosis específica, dependiendo del estado patológico, el sujeto, la duración del tratamiento, la presencia de otros ingredientes activos, etc. En general, las composiciones comprenden dosis unitarias de entre 10 ng y 100 mg de polipéptido de fusión, más preferiblemente entre 1 µg y 50 mg, aún más preferiblemente entre 100 µg y 50 mg.
40
45

50 Las composiciones de la presente invención se administran preferiblemente en cantidades eficaces, es decir, en cantidades que son, a lo largo del tiempo, suficientes para al menos reducir o prevenir la progresión de la enfermedad. A este respecto, las composiciones de esta invención se usan preferiblemente en cantidades que permiten la reducción de una respuesta inmunitaria perjudicial o indeseable en un sujeto.

Como se mencionó anteriormente, los polipéptidos de fusión de esta invención tienen una actividad reguladora intensa del sistema inmunitario y se pueden usar para tratar una diversidad de enfermedades asociadas a una respuesta inmunitaria anormal o indeseable. De manera más específica, los polipéptidos de esta invención son adecuados para tratar trastornos relacionados con el sistema inmunitario tales como, en particular, rechazo de
55

órganos o tejidos, enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunitarias.

Como se describe en la sección experimental, los polipéptidos de esta invención pueden inhibir sustancialmente el rechazo de injertos alogénicos o xenogénicos in vivo.

5 Un objetivo de la presente invención reside así en un polipéptido o composición como se describió anteriormente para tratar el rechazo de injertos.

Un objetivo adicional de esta invención reside en proporcionar un método para tratar el rechazo de injertos en un sujeto, y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición como se describió anteriormente.

10 El término tratar designa, por ejemplo, la promoción de la tolerancia a injertos en el sujeto receptor. El tratamiento se puede llevar a cabo antes, durante y/o después del injerto, y se puede usar como una terapia alternativa a los agentes inmunosupresores existentes, o como una terapia combinada con agentes inmunosupresores concretos. La invención es aplicable al trasplante alogénico, semi-alogénico o incluso xenogénico, y se puede usar para cualquier tipo de órganos o tejidos trasplantados que incluyen, sin limitación, tejidos sólidos, tejidos líquidos o células, que incluyen corazón, piel, riñón, hígado, pulmón, hígado-riñón, etc.

15 Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar un método mejorado para trasplantar un órgano o tejido en un sujeto, y la mejora comprende administrar al sujeto, antes, durante y/o después del trasplante, una cantidad eficaz de una composición como se describió anteriormente.

20 Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar un método para promover la tolerancia a injertos en un sujeto, y el método comprende administrar al sujeto, antes, durante y/o después del trasplante, una cantidad eficaz de una composición como se describió anteriormente.

Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar un método para reducir el rechazo de injertos en un sujeto, y el método comprende administrar al sujeto, antes, durante y/o después del trasplante, una cantidad eficaz de una composición como se describió anteriormente.

25 Un objetivo adicional de la presente invención reside en un polipéptido o composición como se describió anteriormente para tratar una enfermedad autoinmunitaria. La invención también proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición como se describió anteriormente. La enfermedad autoinmunitaria puede ser artritis reumatoide, enfermedad de Crohn o esclerosis múltiple. En tales enfermedades, la invención permite reducir la respuesta inmunitaria perjudicial que es responsable de la patología.

30 Otro objetivo de la presente invención reside en un polipéptido o composición como se describió anteriormente para tratar una enfermedad inflamatoria.

Un objetivo adicional de esta invención reside en la provisión de un método para tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto, y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición como se describió anteriormente.

35 Se debería entender que la cantidad de la composición realmente administrada debe ser determinada y adaptada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes que incluyen la afección o afecciones a tratar, la composición exacta administrada, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y la vía de administración elegida. Por lo tanto, los intervalos de dosis anteriores pretenden proporcionar una guía y apoyo general para las enseñanzas de la presente memoria, pero no pretenden limitar el alcance de la invención.

40 Los aspectos y ventajas adicionales de esta invención se describirán en los ejemplos siguientes, que se deberían considerar ilustrativos y no limitantes del alcance de esta solicitud.

Ejemplos

Materiales y Métodos

45 Amplificación mediante PCR

Se llevaron a cabo las PCR en un GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) en un volumen final de 50 µl que contenía 20 ng de ADN, 200 nM de cada cebador, 200 µM de dNTP (Invitrogen), 2,5 µl de Tampón de PCR 10X (Perkin Elmer), 2,5 Unidades de Taq polimerasa (Perkin Elmer) y 27 µl de agua.

El programa usado fue el siguiente:

50 Desnaturalización del ADN durante 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de:

30 segundos a 94 °C

30 segundos a 58 °C

1 minuto a 72 °C

Al final del último ciclo, se llevó a cabo una etapa de 5 minutos a 72 °C

5 Vectores

Los vectores pFUSE-hFc1 y pFUSE-mFc2 se adquirieron de la empresa InvivoGen.

Digestión enzimática

10 Las digestiones con las enzimas de restricción se llevaron a cabo como recomendó el fabricante (Invitrogen). En general, las digestiones se llevaron a cabo durante 1 hora a 37 °C con 1 µg de ADN y 5 unidades de enzimas de restricción en el tampón adecuado.

Ligaduras

15 La ligadura de los fragmentos de PCR en el vector de expresión se llevó a cabo con la ADN ligasa de T4 de Promega como recomendó el fabricante. Para la construcción HLA-G5-beta-2 microglobulina, la ligadura del fragmento de PCR en pcDNA 3.1 D/V.5-His-Topo (Invitrogen) se llevó a cabo directamente con el equipo de expresión 3.1 Directional TOPO® (Invitrogen).

Purificación de plásmidos

La purificación de los plásmidos se llevó a cabo con el GenElute™ Plasmid Midiprep (Sigma) como recomendó el fabricante.

Producción de proteínas

20 Para la producción de la proteína de fusión, se transfectaron células HEK293T o HELA mediante las diversas construcciones con el método de lipofectamina (Invitrogen) y se mantuvieron a 37 °C, 5% de CO₂ en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) complementado con un 10% de suero bovino fetal y glutamina 0,3 M. Después de 48 horas se recogieron los sobrenadantes, se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm y después se usaron para los experimentos o para preparar disoluciones de reserva.

25 Ejemplo 1: Clonación y síntesis de HLA-G6-Fc

La secuencia de cADN de HLA-G de la secuencia líder, α1, α3 y el intrón 4 se amplificaron mediante PCR con un molde de pcDNA de HLA-G6. Esta secuencia se amplificó mediante PCR para introducir sitios de restricción Age I y Xho I con los cebadores siguientes:

5'AAA**ACCGG**TATGGTGGTCATGGCGCCCCG 3' (SEQ ID N°: 7)

30 y

5'AA**ACTCGAG**AGGTCTTCAGAGAGGCTCCTGCTT' (SEQ ID N°: 8).

Esta secuencia amplificada se digirió con las enzimas de restricción Age I y Xho I y después se ligó en el vector pFUSE-hFc1 digerido previamente con Age I y Xho I. La secuencia de cADN resultante se describe en SEQ ID N°: 1 y la secuencia de aminoácidos se describe en SEQ ID N°: 2.

35 La proteína se produjo como se describió en los materiales y métodos.

Ejemplo 2: Clonación y síntesis de HLA-G1-B2M-Fc

40 La secuencia que codifica la Beta-2 microglobulina humana se amplificó mediante PCR con los cebadores B2M Sig **Mlu I Sph** IS cgtc **GCATGC ACGCGT** CG ATG TCT CGC TCC GTG GCC (SEQ ID N°: 9) y B2M-L-a1 AS **TCATGGAGTGGGAGCC** GGATCCGCCACCTCC GGATCCGCCACCTCC GGATCCGCCACCTCC CATGTCTCGATCCCCTT (SEQ ID N°: 10) que permitieron eliminar el codón de parada e introducir un espaciador que correspondía a la secuencia de aminoácidos (GGGS)x2.

45 En paralelo, la secuencia de cADN que correspondía al dominio α1, α2 y α3 de HLA-G 1 se amplificó mediante PCR con los cebadores HLA-Ga3 **Xho Sal** AS tatg **GTCGAC CTCGAG** CGC AGC TGC CTT CCA TCT CAG CAT GAG (SEQ ID N°: 11) y HLA-G a1 **Mlu Sph** S acgtc **GCATGC ACGCGT** CG GGC TTC CAC TCC ATG A (SEQ ID N°: 12) que permitieron eliminar la secuencia líder del péptido y el codón de parada. Los fragmentos de PCR de la beta-2 microglobulina y del dominio α1, α2, α3 de HLA-G1 se digirieron con la enzima de restricción Eag I, se purificaron y se ligaron. La secuencia de fusión Beta-2 microglobulina / dominio α1, α2, α3 obtenida se digirió después con las

enzimas de restricción Mlu I y Xho I y se ligó en el vector PGEMT/easy (Promega) digerido previamente con Mlu I y Xho I. Esta construcción se amplificó después mediante PCR con los cebadores B2M Sig **Mlu I Sph I** IS cgct **GCATGC ACGCGT** CG ATG TCT CGC TCC GTG GCC (SEQ ID N°: 13) y HLA-Ga3 **Xho Sal** AS tatg **GTCGAC CTCGAG** CGC AGC TGC CTT CCA TCT CAG CAT GAG (SEQ ID N°: 14). El fragmento amplificado obtenido se digirió después con Age I y Xho I y se introdujo en el sitio de clonación Age I y Xho I del vector pFUSE-hFc1 para que estuviera en fase con el cADN que codificaba el Fc de IgG2 humana (InVivogen, Toulouse, Francia). La secuencia de cADN resultante se describe en SEQ ID N°: 3 y la secuencia de aminoácidos se describe en SEQ ID N°: 4.

La proteína se produjo como se describió en los materiales y métodos.

10 Ejemplo 3: Clonación y síntesis de HLA-Gα1-Fc

La secuencia de cADN del dominio alfa-1 de HLA-G se amplificó mediante PCR con el uso de los cebadores 5'AAA **GAA TTC** GGG CTC CCA CTC CAT GAG GT 3' (SEQ ID N°: 15) y 5'AAA **GAT ATC** CCA CTG GCC TCG CTC TGG TTG3' (SEQ ID N°: 16). Tras la digestión con enzimas de restricción del fragmento de PCR alfa-1 y el vector pFUSE-mFc2 (Invivogen) con las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV, el fragmento de PCR alfa-1 se ligó en el vector pFUSE-mFc2 que contenía la secuencia señal de IL-2 y la región Fc de IgG2a de ratón. La secuencia de cADN resultante se describe en SEQ ID N°: 5 y la secuencia de aminoácidos se describe en SEQ ID N°: 6.

La proteína se produjo como se describió en los materiales y métodos.

Ejemplo 4: Las proteínas de fusión HLA-G/Fc forman dímeros

La Figura 1 representa la migración de proteínas diméricas ("no reducidas" (a la izquierda)) y monoméricas ("reducidas" (a la derecha)) de HLA-G-beta-2-microglobulina/Fc mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas HLA-G/Fc presentes en el sobrenadante se inmunoprecipitaron con microesferas de Proteína G-sefarosa (GE Healthcare). Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con PBS 1X. Las proteínas se eluyeron después mediante incubación con tampón de muestras que contenía ditiotreitól 10 mM ("reducidas") o no ("no reducidas"), se sometieron a ebullición, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Pharmacia Biosciences). Tras la incubación con un 5% de leche desnatada en PBS 1X, la membrana se incubó durante la noche con anticuerpo anti-HLA-G (4H84) y se reveló mediante el uso de anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado a peroxidasa de rábano. Las membranas se revelaron con el sistema de detección ECL (Amersham Pharmacia Biosciences).

Los resultados presentados demuestran la capacidad de las proteínas HLA-G/Fc de esta invención de formar dímeros.

Ejemplo 5: Las proteínas de fusión HLA-G-Fc inducen la señalización por medio del receptor ILT2

Este ejemplo describe el efecto de las proteínas de fusión HLA-G-Fc de esta invención en un ensayo de células indicadoras NFAT, para determinar la unión al receptor ILT2 y la señalización posterior.

Material

35 Microesferas de sulfato-látex del 4%p/v de 5 µm (Invitrogen)

Fragmento Fc anti-IgG de ratón de cabra AffiniPure de 1,8 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)

Fragmento Fc anti-IgG de ratón de cabra AffiniPure de 1,3 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)

Control Negativo de Hela

HLA- G1-b2m/hFc1 1,5 µg/ml

40 HLA- G6/Fc 0,5 µg/ml

Células indicadoras NFATGFP

Método

Las células indicadoras NFATGFP se cultivaron durante 2 días antes del ensayo. Brevemente, las células indicadoras y las microesferas revestidas con la proteína de fusión HLA-G/Fc se co-cultivaron en una proporción 1:5 durante 16 h y después se analizó la expresión de GFP mediante citometría de flujo.

Resultados

Los resultados se representan en la Figura 2, y demuestran que las proteínas de fusión son capaces de inducir la expresión de GFP, lo que indica que son funcionalmente activas.

Ejemplo 6: Efecto de las proteínas de fusión HLA-G/Fc sobre el trasplante de piel alogénico

Materiales

Microesferas de sulfato-látex del 4%p/v de 5 µm (Invitrogen)

Fragmento Fc anti-IgG de ratón de cabra AffiniPure de 1,8 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)

5 Fragmento Fc anti-IgG de ratón de cabra AffiniPure de 1,3 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)

Control Negativo de HeLa

HLA-G1-b2m/hFc1 1,5 µg/ml,

alfa1/mfc2 1,5 µg/ml

HLA- G6/Fc 0,5 µg/ml.

10 Método

15 Para cada proteína de fusión HLA-G/Fc, 10^8 microesferas de Sulfato-látex se revistieron con 20 µg/ml de fragmento Fc anti-IgG de ratón (o anti-humano) de cabra AffiniPure 2 hr a 37 °C, seguido de una incubación de 2 hr con BSA (2 mg/ml). Después de lavar, las microesferas se incubaron con 0,5 µg/ml de proteínas de fusión HLA-G/Fc a 4 °C durante 16 hr. Posteriormente, las microesferas se lavaron 2 veces con PBS 1x. Se usaron 5 ml de proteínas de fusión HLA-G/Fc (1 µg/ml) para 5×10^6 microesferas de sulfato-látex. Como control negativo, se prepararon microesferas de sulfato-látex de una manera idéntica, excepto porque se usó PBS 1x o Control Negativo de HeLa en lugar de las proteínas de fusión HLA-G/Fc. Se inyectaron microesferas de sulfato-látex (5×10^6) de manera intraperitoneal en el día antes del injerto de piel.

20 Se usaron ratones C57BL/6 (H-2b) exentos de patógenos específicos y ratones transgénicos para ILT4 (H-2b) (8-10 semanas de edad) como receptores de los injertos de piel a lo largo de todo el estudio. Los ratones receptores recibieron microesferas acopladas a HLA-G. La piel donante fue de ratones B6.CH-2bm12 (bm12, H-2b) dispare de la clase II del MHC. Se han llevado a cabo injertos de piel alogénicos mediante métodos habituales. Brevemente, la piel (1,0 cm²) de la cola de los ratones donantes (12-14 semanas de edad) se injertó sobre el flanco de los ratones receptores anestesiados. El injerto se cubrió con gasa y esparadrappo, que se eliminaron en el día 10. Los injertos se puntuaron diariamente hasta el rechazo (definido como un 80% de tejido injertado transformado en necrótico y con un tamaño reducido). Todos los datos de supervivencia de los injertos de piel se analizaron mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.

25 Resultados

30 Los resultados se representan en las Figuras 3-5. Demuestran que todas las proteínas de fusión fueron capaces de mejorar sustancialmente la tolerancia a los injertos in vivo. En particular, demuestran que las proteínas de fusión son capaces de mejorar hasta un 50% la tolerancia a los injertos (véase, p.ej., la Fig. 5), que es muy sorprendente e importante. Se debería indicar que cada día de supervivencia del injerto en el modelo corresponde a aproximadamente al menos un mes de supervivencia del injerto en sujetos humanos, de forma que se cree que las proteínas de esta invención mejoran la supervivencia del injerto en al menos 10 meses en los sujetos humanos.

35

LISTADO DE SECUENCIAS.

SEQ ID N°: 1 - Secuencia de cADN para HLA-G6-hFc de IgG2

Secuencia de ADN **alfa-1 sec. señal/alfa-1/alfa-3/intrón-4/MCS/hFc de IgG2**

ACCGGTATGGTGGTCATGGCGCCCCGAACCCTCTTCCTGCTACTCTCGG
GGCCCTGACCCTGACCGAGACCTGGGCGGGCTCCCACTCCATGAGGTA
TTTCAGCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCC
ATGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCG
TGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGA
GTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCACGCACAGACTGACA
GAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCAAC
CCCCAAGACACACGTGACCCACCACCCTGTCTTTGACTATGAGGCCACCCT
GAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCATACTGACCTGGCA
GCGGGATGGGGAGGACCAGACCCAGGACGTGGAGCTCGTGGAGACCAGGC
CTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTG
GAGAGGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGGAG
CCCCTCATGCTGAGATGGAGTAAGGAGGGAGATGGAGGCATCATGTCTGTT
AGGGAAAGCAGGAGCCTCTCTGAAGACCTCTCGAGCACCATGGTTAGATCT
GTGGAGTGCCACCTTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCTTCAGTC
TTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACC
CTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGG
TCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCG
TCCTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT
GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

5 SEQ ID N°: 2: Secuencia proteica de HLA-G6-hFc de IgG2

Secuencia señal: aminoácidos 1-24

G6: aminoácidos 25-227

MCS: aminoácidos 228-234

Fc: aminoácidos 235-452

M V V M A P R T L F L L L S G A L T L T E T W A G S H S M R
Y F S A A V S R P G R G E P R F I A M G Y V D D T Q F V R F

10

D S D S A C P R M E P R A P W V E Q E G P E Y W E E E T R N
 T K A H A Q T D R M N L Q T L R G Y Y N Q S E A N P P K T H
 V T H H P V F D Y E A T L R C W A L G F Y P A E I I L T W Q
 R D G E D Q T Q D V E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V
 V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P E P L M L R W S K E G
 D G G I M S V R E S R S L S E D L S S T M V R S V E C P P C
 P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T
 C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G M E V H N A K T K
 P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K
 C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T
 L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
 W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L
 T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
 L S L S P G K Stop

SEQ ID N°: 3: Secuencia de ADN de HLA-G1 β2m hFc IgG2

sec. señal B2m/Beta 2m/ligador/α1/α2/α3/ hFc de IgG2

ACCGGTATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTT
CTGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGT
CATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTG
GGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAG
AATTGAAAAAGTGGAGCATTGACTTGTCTTTCAGCAAGGACTGGTCT
TTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCACTGAAAAAGATGAGT
ATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACCTTGTACAGCCCAAGATAGTTAA
GTGGGATCGAGACATGGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGCGGATCCGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTAGCGCCCGCGTGT
CCCGGCCCGGCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGG
ACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGGCGTGTCCGAGGA
TGGAGCCCGGGCGCCGTGGGTGGAGGAGGGGGCCGGAGTATTGG
GAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCACGCACAGACTGACAGAATG
AACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCAGTTCT
CACACCCTCCAGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGC
CTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTACGATGGCAAGGATTACCTC
GCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTGCGGCT
CAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCCAATGTGGCTGAACAAAGG
AGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTG
GAGAACGGGAAGGAGATGCTGCAGCGCGCGGACCCCCCAAGACACA
CGTGACCCACCACCCTGTCTTTGACTATGAGGCCACCCTGAGGTGCTG
GGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCATACTGACCTGGCAGCGGGA
TGGGGAGGACCAGACCAGGACGTGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCCTG
CAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTG
GAGAGGAGCAGAGATACAGTGCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCG
GAGCCCCTCATGCTGAGATGGAAGGCAGTTGCCTCGAGCACCATGGTTAG
ATCTGTGGAGTGGCCACCTTGGCCATCGAGCACCATGGTTAGATCTGTGGAGTG
CCCACCTTGGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCTTCAGTCTTCTCTTC
CCCCAAAACCAAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCTGAGGTC

ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCA
CGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID N°: 4: Proteína HLA-G1 β2m hFc IgG2

sec. señal B2m: aminoácidos 1-20

Beta 2m: aminoácidos 21-119

5 Ligador: aminoácidos 120-134

α1/α2/α3: aminoácidos 135-412

hFc de IgG2 aminoácidos 413-FIN

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A I Q R T P K I Q V Y
S R H P A E N G K S N F L N C Y V S G F H P S D I E V D L L
K N G E R I E K V E H S D L S F S K D W S F Y L L Y Y T E F
T P T E K D E Y A C R V N H V T L S Q P K I V K W D R D M G
G G G S G G G G S G G G G S G S H S M R Y F S A A V S R P G
R G E P R F I A M G Y V D D T Q F V R F D S D S A C P R M E
P R A P W V E E E G P E Y W E E E T R N T K A H A Q T D R M
N L Q T L R G Y Y N Q S E A S S H T L Q W M I G C D L G S D
G R L L R G Y E Q Y A Y D G K D Y L A L N E D L R S W T A A
D T A A Q I S K R K C E A A N V A E Q R R A Y L E G T C V E
W L H R Y L E N G K E M L Q R A D P P K T H V T H H P V F D
Y E A T L R C W A L G F Y P A E I I L T W Q R D G E D Q T Q
D V E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q R
Y T C H V Q H E G L P E P L **M** L R W K A V A S S T M V R S V
E C P P C P S S T M V R S V E C P P C P A P P V A G P S V F
L F P P K P K D T L **M** I S R T P E V T C V V V D V S H E D P
E V Q F N W Y V D G **M** E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R
V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P

I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
 Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y
 K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

SEQ ID N°: 5: Secuencia de ADN de sec. señal IL2/alfa-1/MCS/Fc de IgG2a de ratón

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGICA
CGAATTCGGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTAGCGCCGCCCGTGTCCCGGCC
CGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGACGACACGCA
GTTTCGTGCGGTTGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGC
GCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGA
ACACCAAGGCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCG
GCTACTACAACCAGAGCGAGGCCAGTGGGATATCGGCCATGGTTAGATCTCCC
AGAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCT
AACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGG
ATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGA
TGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAA
CGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAA
CAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTG
GATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCC
AGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAAGTAAGAGC
TCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAA
CAGGTCACTCTGACCTGCATGGTACAGACTTCATGCCTGAAGACATTT
ACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACA
CTGAACCAGTCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCT
GAGAGTGGAAAAGAAGAAGTGGGTGGAAAAGAAATAGCTACTCCTGTTC
AGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACACACGACTAAGAGCTTCTC
CCGACTCCGGGTAAATGA

SEQ ID N°: 6:

5 sec. señal de IL2: aminoácidos 1-20

alfa-1: aminoácidos 21-110

MCS: aminoácidos 111-119

Fc de IgG2a de ratón: aminoácidos 120-FIN

M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S G S H S M R Y F S A
A V S R P G R G E P R F I A M G Y V D D T Q F V R F D S D S
A C P R M E P R A P W V E Q E G P E Y W E E E T R N T K A H
A Q T D R M N L Q T L R G Y Y N Q S E A S G I S A M V R S P
R G P T I K P C P P C K C P A P N L L G G P S V F I F P P K
I K D V L M I S L S P I V T C V V V D V S E D D P D V Q I S
W F V N N V E V H T A Q T Q T H R E D Y N S T L R V V S A L
P I Q H Q D W M S G K E F K C K V N N K D L P A P I E R T I

S K P K G S V R A P Q V Y V L P P P E E E M T K K Q V T L T
C M V T D F M P E D I Y V E W T N N G K T E L N Y K N T E P
V L D S D G S Y F M Y S K L R V E K K N W V E R N S Y S C S
V V H E G L H N H H T T K S F S R T P G K Stop

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> HLA-G TECHNOLOGIES

<120> Proteínas HLA-G y usos farmacéuticos de las mismas

<130> B795PC00

5 <160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1380

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cADN para HLA-G6-hFc de IgG2

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <223> secuencia de ADN alfa-1 sec. señal/alfa-1/alfa-3/intrón-4/MCS/hFc de IgG2

<400> 1

```

accggtatgg tggatcatggc gccccgaacc ctcttctctgc tactctcggg ggccctgacc      60
ctgaccgaga cctggggcggg ctcccactcc atgaggtatt tcagcgccgc cgtgtcccgg      120
cccggccgcg gggagccccg cttcatcgcc atgggctacg tggacgacac gcagttcgtg      180
cggttcgaca gcgactcggc gtgtccgagg atggagccgc gggcgccgtg ggtggagcag      240
gaggggcccag agtattggga agaggagaca cggaacacca aggcccacgc acagactgac      300
agaatgaacc tgcagaccct gcgcggctac tacaaccaga gcgaggccaa ccccccaag      360
acacacgtga cccaccacc tgtctttgac tatgaggcca ccctgaggtg ctgggcccctg      420
ggcttctacc ctgcgggat cactactgacc tggcagcggg atggggagga ccagaccag      480
gacgtggagc tcgtggagac caggcctgca ggggatggaa ccttccagaa gtgggcagct      540
gtggtggtgc cttctggaga ggagcagaga tacacgtgcc atgtgcagca tgaggggctg      600
ccggagcccc tcatgctgag atggagtaag gagggagatg gaggcacat gtctgttagg      660
gaaagcagga gcctctctga agacctctcg agcaccatgg ttagatctgt ggagtgccca      720
ccttgcccag caccacctgt ggcaggacct tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag      780
gacaccctga tgatctccag aaccctgag gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac      840
gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggacggca tggaggtgca taatgccaa      900
acaagccac gggaggagca gttcaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc      960
gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctcaa caaaggcctc     1020

```

ES 2 423 993 T3

ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa accaaagggc agccccgaga accacaggtg 1080
tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1140
gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200
aacaactaca agaccacacc tcccatgctg gactccgacg gtccttctt cctctacagc 1260
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1320
catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaata 1380

<210> 2

<211> 457

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de HLA-G6-hFc de IgG2

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(24)

<223> Secuencia señal

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(227)

15 <223> G6

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (228)..(234)

<223> MCS

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (235)..(457)

<223> Fc

<400> 2

ES 2 423 993 T3

Met Val Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Phe Leu Leu Leu Ser Gly Ala
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
20 25 30

Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
35 40 45

Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser
50 55 60

Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly

ES 2 423 993 T3

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 3

<211> 1977

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ADN de HLA-G1 Beta2m hFc IgG2

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> sec. señal B2m/Beta 2m/ligador/alfa1/alfa2/alfa3/ hFc de IgG2

<400> 3

accggtatgt ctgctccgt gcccttagct gtgctcgcgc tactctctct tcttggcctg 60

gaggctatcc agcgtactcc aaagattcag gtttactcac gtcattccagc agagaatgga 120

aagtcaaatt tcttgaattg ctatgtgtct gggtttcatc catccgacat tgaagttgac 180

ttactgaaga atggagagag aattgaaaaa gtggagcatt cagacttgtc tttcagcaag 240

gactggtctt tctatctctt gtactacact gaattcaccc ccaactgaaa agatgagtat 300

ES 2 423 993 T3

gcctgccgtg tgaacatgt gaccttgtca cagcccaaga tagttaagtg ggatcgagac 360
atgggaggtg gcggatccgg aggtggcgga tccggaggtg gcggatccgg ctcccactcc 420
atgaggtatt tcagcgccgc cgtgtcccgg cccggcccg gggagccccg cttcatcgcc 480
atgggctacg tggacgacac gcagttctgt cggttcgaca gcgactcggc gtgtccgagg 540
atggagccgc gggcgccgtg ggtggaggag gaggggccgg agtattggga agaggagaca 600
cggaacacca aggcccacgc acagactgac agaatgaacc tgcagaccct gcgcggtac 660
tacaaccaga gcgaggccag ttctcacacc ctccagtgga tgattggctg cgacctgggg 720
tccgacggac gcctcctccg cgggtatgaa cagtatgcct acgatggcaa ggattacctc 780
gccctgaacg aggacctgcg ctctctggacc gcagcggaca ctgcggctca gatctccaag 840
cgcaagtgtg aggcggccaa tgtggctgaa caaaggagag cctacctgga gggcacgtgc 900
gtggagtggc tccacagata cctggagaac ggggaaggaga tgctgcagcg cgcggacccc 960
cccaagacac acgtgaccca ccaccctgtc tttgactatg aggccaccct gaggtgctgg 1020
gccctgggct tctaccctgc ggagatcata ctgacctggc agcgggatgg ggaggaccag 1080
accagagacg tggagctcgt ggagaccagg cctgcagggg atggaacctt ccagaagtgg 1140
gcagctgtgg tggcgccttc tggagaggag cagagataca cgtgccatgt gcagcatgag 1200
gggctgccgg agcccctcat gctgagatgg aaggcagttg cctogagcac catggttaga 1260
tctgtggagt gcccaccttg cccatcgagc accatggtta gatctgtgga gtgcccacct 1320
tgcccagcac cacctgtggc aggaccttca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 1380
accctgatga tctccagaac ccctgaggtc acgtgctggtg tgggtggacgt gagccacgaa 1440
gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gacggcatgg aggtgcataa tgccaagaca 1500
aagccacggg aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcgtg 1560
caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca 1620
gccccatcg agaaaacat ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1680
acctgcccc catccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1740
aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1800
aactacaaga ccacacctcc catgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag 1860
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaactct tctcatgctc cgtgatgat 1920
gaggctctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1977

<210> 4

<211> 656

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Proteína HLA-G1 Beta2m hFc IgG2

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (1)..(20)

<223> sec. señal B2m

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(119)

10 <223> Beta 2m

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (120)..(134)

<223> Ligador

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (135)..(912)

<223> alfa1/alfa2/alfa3

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (413)..(656)

<223> hFc de IgG2

<400> 4

ES 2 423 993 T3

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
100 105 110

ES 2 423 993 T3

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala
 130 135 140

Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys
 165 170 175

Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val Glu Glu Glu Gly Pro Glu
 180 185 190

Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp
 195 200 205

Arg Met Asn Leu Gln Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
 210 215 220

Ser Ser His Thr Leu Gln Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp
 225 230 235 240

Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp
 245 250 255

Tyr Leu Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr
 260 265 270

Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu
 275 280 285

Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg
 290 295 300

Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys
 305 310 315 320

Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg
 325 330 335

Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln
 340 345 350

Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg

ES 2 423 993 T3

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
625 630 635 640

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
645 650 655

<210> 5

<211> 1056

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ADN de sec. señal IL2/alfa-1/MCS/Fc de IgG2a de ratón

<400> 5

```

atgtacagga tgcaactcct gtcttgacatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg      60
ggctcccact ccatgaggtg tttcagcgcc gccgtgtccc ggcccggccg cggggagccc      120
cgcttcatcg ccatgggcta cgtggacgac acgcagttcg tgcggttcga cagcgactcg      180
gcgtgtccga ggatggagcc gcgggcccgc tgggtggagc aggaggggccc agagtattgg      240
gaagaggaga cacggaacac caaggcccac gcacagactg acagaatgaa cctgcagacc      300
ctgcgoggct actacaacca gagcgaggcc agtgggatat cggccatggt tagatctccc      360
agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt      420
ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc      480
cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc      540
tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca gctcagacac aaacccatag agaggattac      600
aacagtactc tccgggtggt cagtgccctc cccatccagc accaggactg gatgagtggc      660
aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc      720
tcaaaacca aagggtcagt aagagctcca caggtatatg tcttgctcc accagaagaa      780
gagatgacta agaaacaggt cactctgacc tgcattggtc cagacttcat gcctgaagac      840
atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa acagagctaa actacaagaa cactgaacca      900
gtcctggact ctgatggttc ttacttcatg tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac      960
tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca gtggtccacg agggctctgca caatcaccac     1020
acgactaaga gcttctcccg gactccgggt aatatg                                1056

```

10 <210> 6

<211> 351

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de sec. señal IL2/alfa-1/MCS/Fc de IgG2a de ratón

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> sec. señal IL2

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (21)..(110)

<223> alfa-1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (111)..(119)

15 <223> MCS

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (120)..(351)

<223> Fc de IgG2a de ratón

20 <400> 6

ES 2 423 993 T3

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val
 20 25 30

Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val
 35 40 45

Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg
 50 55 60

Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp
 65 70 75 80

Glu Glu Glu Thr Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met
 85 90 95

Asn Leu Gln Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Gly
 100 105 110

Ile Ser Ala Met Val Arg Ser Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
 115 120 125

ES 2 423 993 T3

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 130 135 140

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser
 145 150 155 160

Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
 165 170 175

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
 180 185 190

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
 195 200 205

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
 210 215 220

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile
 225 230 235 240

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro
 245 250 255

Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
 260 265 270

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
 275 280 285

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

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
 305 310 315 320

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
 325 330 335

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 340 345 350

<210> 7

<211> 29

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

ES 2 423 993 T3

<220>
<223> cebadores
<400> 7
aaaaccggta tgggtggcat ggcgccccg 29

5 <210> 8
<211> 33
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>

10 <223> cebadores
<400> 8
aaactcgaga ggtcttcaga gaggctcctg ctt 33
<210> 9
<211> 36

15 <212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebadores
<400> 9

20 cgtcgcatgc acgcgtcgat gtctcgctcc gtggcc 36
<210> 10
<211> 79
<212> ADN
<213> secuencia artificial

25 <220>
<223> cebadores
<400> 10
tcatggagtg ggagccggat ccgccacctc cggatccgcc acctccggat ccgccacctc 60
ccatgtctcg atcccactt 79

30 <210> 11
<211> 43
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebadores

ES 2 423 993 T3

<400> 11
tatggtcgac ctcgagcgca gctgccttcc atctcagcat gag 43
<210> 12
<211> 35
5 <212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebadores
<400> 12
10 acgtcgcatg cacgcgctcg gcttccactc catga 35
<210> 13
<211> 36
<212> ADN
<213> secuencia artificial
15 <220>
<223> cebadores
<400> 13
cgtcgcatgc acgcgctcgat gtctcgtctcc gtggcc 36
<210> 14
20 <211> 43
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebadores
25 <400> 14
tatggtcgac ctcgagcgca gctgccttcc atctcagcat gag 43
<210> 15
<211> 29
<212> ADN
30 <213> secuencia artificial
<220>
<223> cebadores
<400> 15
aaagaattcg ggctcccact ccatgaggt 29
35

<210> 16

<211> 30

<212> ADN

<213> secuencia artificial

5 <220>

<223> cebadores

<400> 16

aaagatatcc cactggcctc gctctggttg

30

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión que comprende (i) un primer polipéptido que comprende la secuencia de un dominio de un antígeno HLA-G unida a (ii) un segundo polipéptido que comprende la secuencia de un dominio Fc de una inmunoglobulina y que carece de un sitio de unión al antígeno funcional de la inmunoglobulina.
- 5 2. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el primer polipéptido está en posición N-ter del polipéptido de fusión, y el segundo polipéptido está en posición C-ter.
3. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1 ó 2, en el que el segundo polipéptido comprende la secuencia de un dominio Fc de una inmunoglobulina humana o murina.
- 10 4. El polipéptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la inmunoglobulina es una IgG, una IgA, una IgM o una IgE, preferiblemente una IgG.
5. El polipéptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno HLA-G es un antígeno HLA-G humano.
6. El polipéptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el dominio de dicho antígeno HLA-G comprende al menos el dominio $\alpha 1$.
- 15 7. El polipéptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho primer polipéptido se selecciona de:
 - la secuencia de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un antígeno HLA-G;
 - la secuencia de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$ de un antígeno HLA-G; o
 - la secuencia de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un antígeno HLA-G.
- 20 8. El polipéptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos primer y segundo polipéptidos están unidos directamente o por medio de un espaciador.
9. El polipéptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un tercer polipéptido que comprende la secuencia de una $\beta 2$ microglobulina.
10. Un polipéptido de fusión, que se selecciona de:
 - 25 - HLA-G1-B2M-Fc que comprende SEQ ID N°: 4, o los residuos de aminoácidos 21-656 del mismo,
 - HLA-Ga1-Fc que comprende SEQ ID N°: 6, o los residuos de aminoácidos 21-351 del mismo, y
 - HLA-G6-Fc que comprende SEQ ID N°: 2, o los residuos de aminoácidos 25-452 del mismo.
11. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 30 12. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11.
13. Una célula hospedadora recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11 o un vector de la reivindicación 12.
14. Un método para producir un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende cultivar una célula hospedadora recombinante de la reivindicación 13 en condiciones que permiten la expresión de la molécula de ácido nucleico, y recuperar el polipéptido producido.
- 35 15. Un dímero de un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
16. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, para tratar el rechazo de órganos o tejidos.
- 40 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, para tratar una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria.

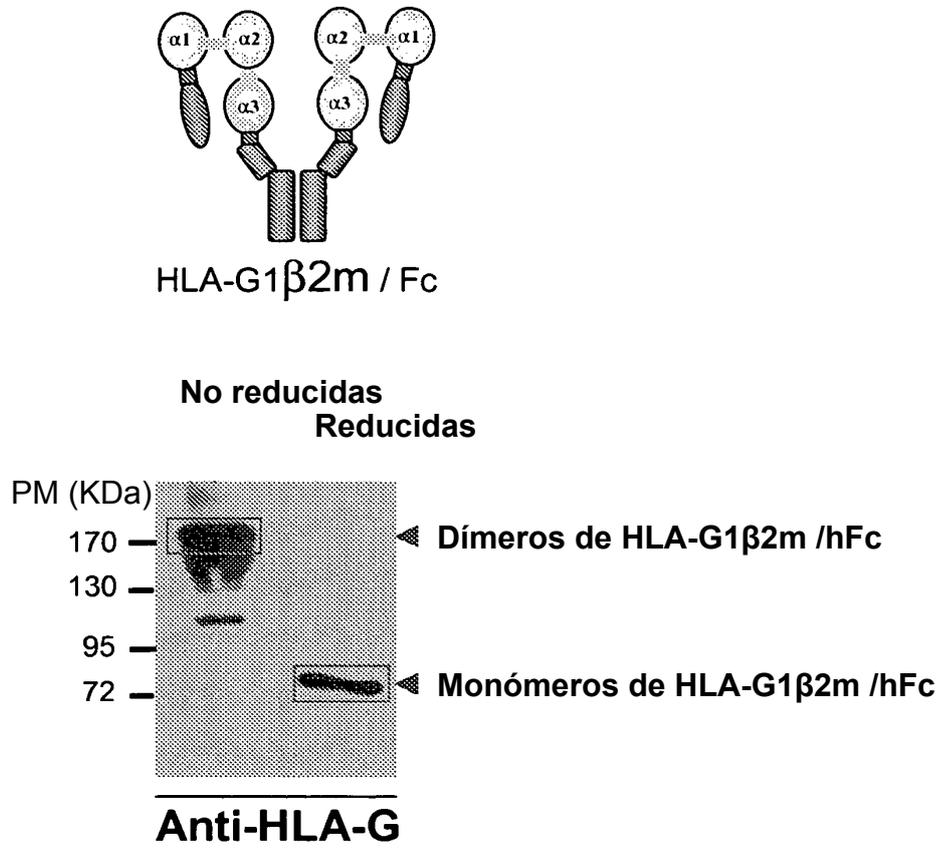
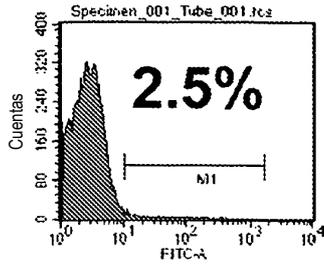


Figura 1

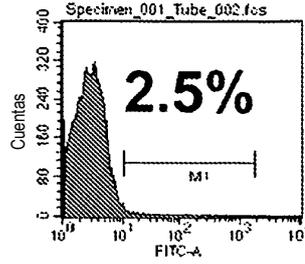
Sin tratamiento



Archivo: Specimen_001_Tube_001.fcs

Marcador	Eventos	%Agrup.	%Total	Media
Todos	15436	100.00	54.75	4.24
M1	495	3.22	1.63	36.05

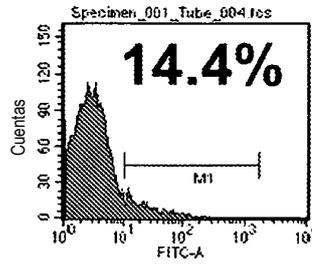
Control negativo



Archivo: Specimen_001_Tube_002.fcs

Marcador	Eventos	%Agrup.	%Total	Media
Todos	18973	100.00	61.24	4.38
M1	471	2.48	1.57	34.57

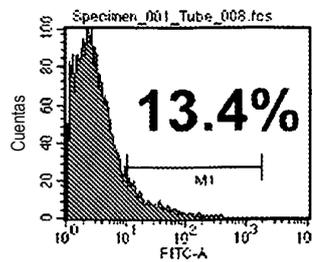
HLA- G1- b2m/hFc1



Archivo: Specimen_001_Tube_004.fcs

Marcador	Eventos	%Agrup.	%Total	Media
Todos	8304	100.00	16.61	7.39
M1	1193	14.37	2.39	29.49

HLA- G6/Fc



Archivo: Specimen_001_Tube_008.fcs

Marcador	Eventos	%Agrup.	%Total	Media
Todos	7815	100.00	15.64	7.68
M1	1123	13.36	2.25	32.56

Figura 2

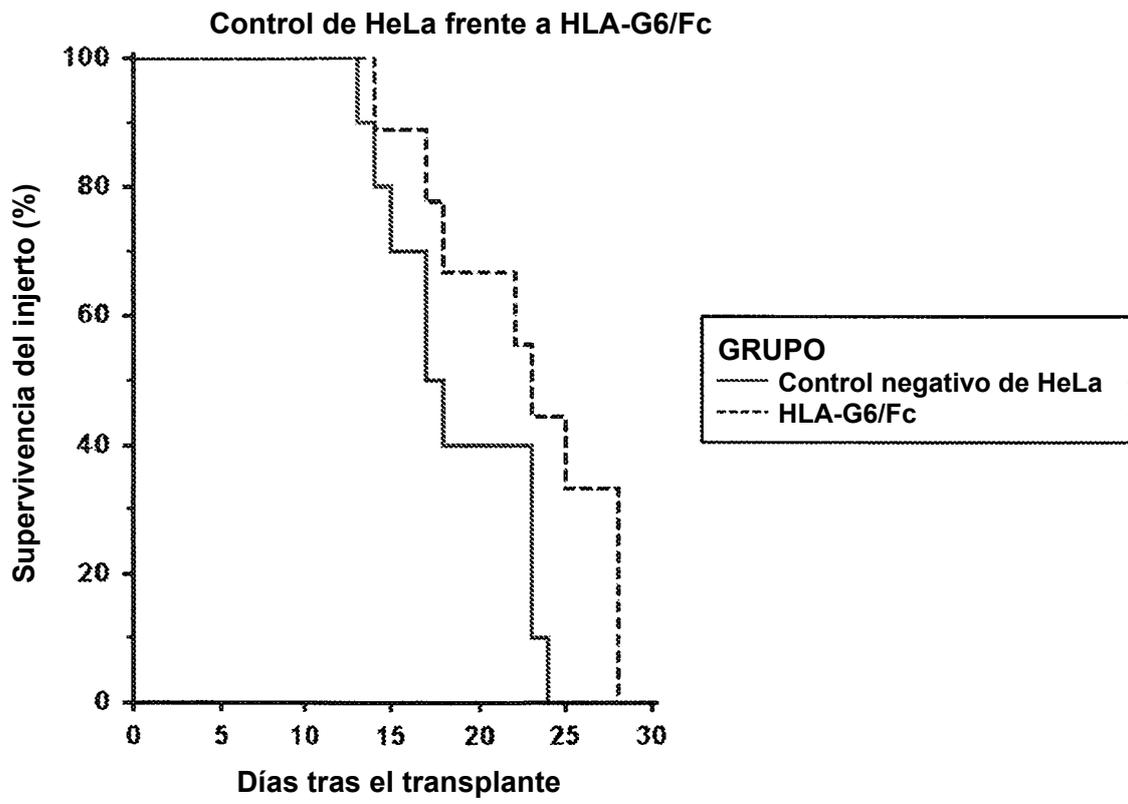


Figura 3

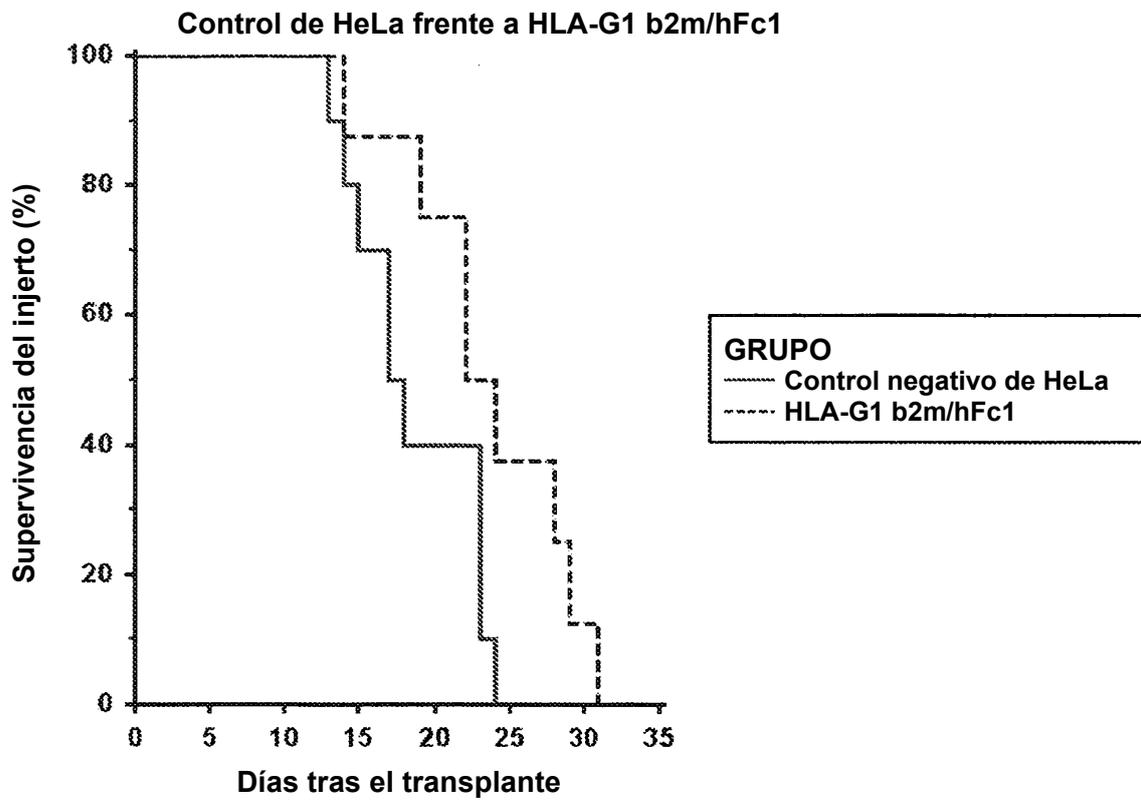


Figura 4

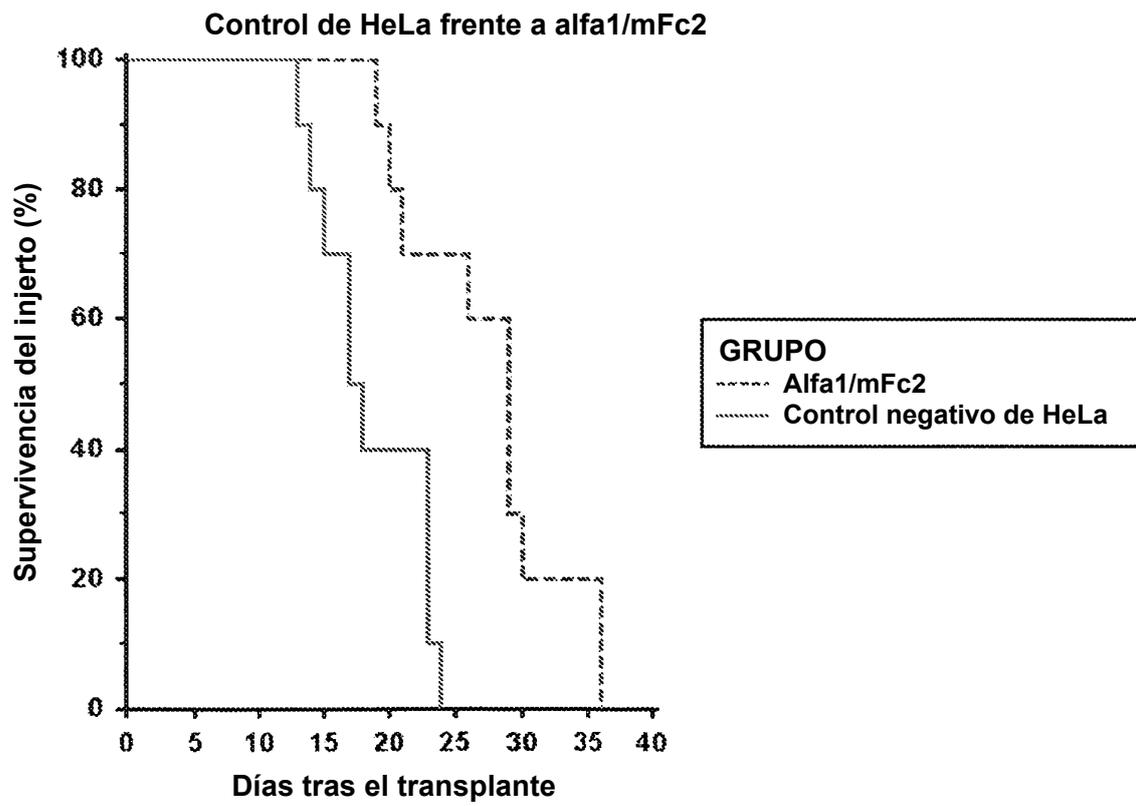


Figura 5