

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 587**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2005** **E 05778764 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014** **EP 1781700**

54 Título: **Proteínas de fusión de RAGE y métodos de uso**

30 Prioridad:

03.08.2004 US 598555 P

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

07.07.2014

73 Titular/es:

**TRANSTECH PHARMA, INC. (100.0%)
SUITE 110, 4170 MENDENHALL OAKS PARKWAY
HIGH POINT, NC 27265, US**

72 Inventor/es:

**MJALLI, ADNAN M.M.;
TIAN, YE E.;
WEBSTER, JEFFREY C. y
ROTHLEIN, ROBERT**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 473 587 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 de fusión de RAGE y métodos de uso

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la regulación del receptor para productos finales de glicosilación avanzada (*Receptor for Advanced Glycated Endproducts*) (RAGE). Más particularmente, la presente invención describe proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de RAGE, métodos de preparación de tales proteínas de fusión y el uso de tales proteínas para el tratamiento de trastornos basados en RAGE.

Antecedentes

La incubación de proteínas o lípidos con azúcares aldosa da como resultado la oxidación y glicosilación no enzimáticas de grupos amino en proteínas para formar aductos de Amadori. Con el tiempo, los aductos experimentan transposiciones, deshidrataciones y reticulaciones adicionales con otras proteínas para formar complejos conocidos como productos finales de glicosilación avanzada (AGE). Los factores que promueven la formación de AGE incluyen recambio de proteínas retrasado (por ejemplo como en amiloidosis), acumulación de macromoléculas que tienen un alto contenido en lisina y altos niveles de glucosa en sangre (por ejemplo como en diabetes) (Hori *et al.*, J. Biol. Chem. 270: 25752-761, (1995)). Se ha implicado a los AGE en una variedad de trastornos incluyendo complicaciones asociadas con diabetes y envejecimiento normal.

Los AGE presentan unión específica y saturable a receptores de superficie celular en monocitos, macrófagos, células endoteliales de la microvasculatura, células de músculo liso, células mesangiales y neuronas. El receptor para productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) es un miembro de la familia de moléculas de supergenes de inmunoglobulinas. El dominio extracelular (N-terminal) de RAGE incluye tres regiones de tipo inmunoglobulina: un dominio de tipo V (variable) seguido por dos dominios de tipo C (constante) (Neeper *et al.*, J. Biol. Chem., 267:14998-15004 (1992); Schmidt *et al.*, Circ. (supl.) 96#194 (1997)). Un único dominio que se extiende a través de la membrana y una cola citosólica corta, altamente cargada siguen al dominio extracelular. El dominio N-terminal, extracelular puede aislarse mediante proteólisis de RAGE o mediante enfoques de biología molecular para generar RAGE soluble (RAGEs) compuesto por los dominios V y C.

RAGE se expresa en múltiples tipos de células incluyendo leucocitos, neuronas, células de la microglía y endotelio vascular (por ejemplo, Hori *et al.*, J. Biol. Chem., 270:25752-761 (1995)). También se encuentran niveles aumentados de RAGE en tejidos envejecidos (Schleicher *et al.*, J. Clin. Invest., 99 (3): 457-468 (1997)), y la retina, la vasculatura y el riñón diabéticos (Schmidt *et al.*, Nature Med., 1:1002-1004 (1995)). También se encuentran niveles aumentados de RAGE en tejidos envejecidos (Schleicher *et al.*, J. Clin. Invest., 99 (3): 457-468 (1997)), y la retina, la vasculatura y el riñón diabéticos (Schmidt *et al.*, Nature Med., 1:1002-1004 (1995)).

Además de AGE, otros compuestos pueden unirse a y modular RAGE. RAGE se une a múltiples ligandos funcional y estructuralmente diversos incluyendo amiloide beta ($A\beta$), amiloide A sérico (SAA), productos finales de glicosilación avanzada (AGE), S100 (un miembro proinflamatorio de la familia de calgranulina), carboximetil-lisina (CML), anfoterina y CD11b/CD18 (Bucciarelli *et al.*, Cell Mol. Life Sci., 59:1117-128 (2002); Chavakis *et al.*, Microbes Infect., 6:1219-1225 (2004); Kokkola *et al.*, Scand. J. Immunol., 61:1-9 (2005); Schmidt *et al.*, J. Clin. Invest., 108:949-955 (2001); Rocken *et al.*, Am. J. Pathol., 162:1213-1220 (2003)).

Se ha mostrado que la unión de ligandos tales como AGE, S100/calgranulina, β -amiloide, CML (N^{ϵ} -carboximetil-lisina) y anfoterina a RAGE modifica la expresión de una variedad de genes. Estas interacciones pueden iniciar entonces mecanismos de transducción de señales incluyendo activación de p38, fosforilación de Erk1-2, MAP cinasas, p21ras y la activación del mediador transcripcional de señalización inflamatoria, NF- κ B (Yeh *et al.*, Diabetes, 50:1495-1504 (2001)). Por ejemplo, en muchos tipos de células, la interacción entre RAGE y sus ligandos puede generar estrés oxidativo, que de ese modo da como resultado la activación del factor de transcripción sensible a radicales libres NF- κ B, y la activación de genes regulados por NF- κ B, tales como las citocinas IL-1 β y TNF- α . Además, la expresión de RAGE se regula por incremento por medio de NF- κ B y muestra expresión aumentada en sitios de inflamación o estrés oxidativo (Tanaka *et al.*, J Biol. Chem., 275:25781-25790 (2000)). Por tanto, puede alimentarse una espiral ascendente y a menudo perjudicial mediante un bucle de retroalimentación positiva iniciado por la unión del ligando.

La activación de RAGE en diferentes tejidos y órganos puede conducir a varias consecuencias fisiopatológicas. Se ha implicado a RAGE en una variedad de estados incluyendo: inflamación aguda y crónica (Hofmann *et al.*, Cell 97: 889-901 (1999)), el desarrollo de complicaciones diabéticas tardías tales como aumento de la permeabilidad vascular (Wautier *et al.*, J. Clin. Invest., 97:238-243 (1995)), nefropatía (Teillet *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol., 11:1488-1497 (2000)), arteriosclerosis (Vlassara *et al.*, The Finnish Medical Society DUODECIM, Ann. Med., 28:419-426 (1996)) y retinopatía (Hammes *et al.*, Diabetologia, 42:603-607 (1999)). Se ha implicado a RAGE también en enfermedad de Alzheimer (Yan *et al.*, Nature, 382:685-691 (1996)) y en invasión y metástasis tumorales (Taguchi *et*

al., Nature, 405:354-357 (2000)).

A pesar de la amplia expresión de RAGE y su aparente papel pleiotrópico en múltiples modelos de enfermedad diversos, RAGE no parece ser esencial para el desarrollo normal. Por ejemplo, ratones deficientes en RAGE no tienen un fenotipo anómalo manifiesto, lo que sugiere que aunque RAGE puede desempeñar un papel en la patología de la enfermedad cuando se estimula de manera crónica, la inhibición de RAGE no parece contribuir a ningún fenotipo agudo no deseado (Liliensiek *et al.*, J. Clin. Invest., 113:1641-50 (2004)).

La unión antagonizante de ligandos fisiológicos a RAGE puede regular por disminución los cambios fisiopatológicos provocados por concentraciones excesivas de AGE y otros ligandos de RAGE. Reduciendo la unión de ligandos endógenos a RAGE, pueden reducirse los síntomas asociados con trastornos mediados por RAGE. RAGE soluble (RAGEs) puede antagonizar eficazmente la unión de ligandos de RAGE a RAGE. Sin embargo, RAGEs puede tener una semivida cuando se administra *in vivo* que puede ser demasiado corta como para ser terapéuticamente útil para uno o más trastornos. Por tanto, hay una necesidad de desarrollar compuestos que antagonicen la unión de AGE y otros ligandos fisiológicos al receptor RAGE teniendo el compuesto un perfil farmacocinético deseable.

Sumario

Las realizaciones de la presente invención comprenden proteínas de fusión de RAGE y usos de tales proteínas tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la presente invención comprenden una proteína de fusión que comprende un polipéptido de RAGE unido a un segundo polipéptido distinto de RAGE. La proteína de fusión comprende un sitio de unión a ligando de RAGE. La proteína de fusión comprende además un polipéptido de RAGE unido directamente a un polipéptido que comprende el dominio C_{H2} de una inmunoglobulina, o una porción del dominio C_{H2}.

La presente invención también comprende un método para preparar una proteína de fusión de RAGE. El método comprende unir un polipéptido de RAGE a un segundo polipéptido distinto de RAGE. El polipéptido de RAGE comprende un sitio de unión a ligando de RAGE. El método puede comprender unir un polipéptido de RAGE directamente a un polipéptido que comprende el dominio C_{H2} de una inmunoglobulina o una porción del dominio C_{H2}.

También se dan a conocer en el presente documento métodos y composiciones para tratar un trastorno mediado por RAGE en un sujeto. El método puede comprender administrar una proteína de fusión de la presente invención al sujeto. La composición puede comprender una proteína de fusión de RAGE de la presente invención en un portador farmacéuticamente aceptable.

Hay diversas ventajas que pueden estar asociadas con realizaciones particulares de la presente invención. En una realización, las proteínas de fusión de la presente invención pueden ser estables metabólicamente cuando se administran a un sujeto. Además, las proteínas de fusión de la presente invención pueden presentar unión de alta afinidad para ligandos de RAGE. En determinadas realizaciones, las proteínas de fusión de la presente invención se unen a ligandos de RAGE con afinidades en el intervalo nanomolar alto a micromolar bajo. Uniéndose con alta afinidad a ligandos de RAGE fisiológicos, las proteínas de fusión de la presente invención pueden usarse para inhibir la unión de ligandos endógenos a RAGE, proporcionando de ese modo medios para mejorar enfermedades mediadas por RAGE.

Además, las proteínas de fusión de la presente invención pueden proporcionarse en forma de proteína o ácido nucleico. En una realización de ejemplo, la proteína de fusión puede administrarse de manera sistémica y permanecer en la vasculatura para tratar posiblemente enfermedades vasculares mediadas en parte por RAGE. En otra realización de ejemplo, la proteína de fusión puede administrarse localmente para tratar enfermedades en las que ligandos de RAGE contribuyen a la patología de la enfermedad. Alternativamente, puede administrarse un constructo de ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión a un sitio mediante el uso de un portador apropiado tal como un virus o ADN desnudo cuando la expresión local transitoria puede inhibir localmente la interacción entre ligandos de RAGE y receptores. Por tanto, la administración puede ser transitoria (por ejemplo, como cuando se administra la proteína de fusión) o de naturaleza más permanente (por ejemplo, como cuando se administra la proteína de fusión como un ADN recombinante).

Breve descripción de las figuras

Diversas características, aspectos y ventajas de la presente invención resultarán más evidentes con referencia a las siguientes figuras.

La figura 1 muestra diversas secuencias de RAGE según realizaciones alternativas de la presente invención: Panel A, SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos para RAGE humano; y SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos para RAGE humano sin la secuencia señal de aminoácidos 1-22; panel B, SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos para RAGE humano sin la secuencia señal de aminoácidos 1-23; panel C, SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de RAGEs humano; SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de RAGEs humano sin la

secuencia señal de aminoácidos 1-22, y SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de RAGEs humano sin la secuencia señal de aminoácidos 1-23; panel D, SEQ ID NO: 7, una secuencia de aminoácidos que comprende el dominio V de RAGE humano; SEQ ID NO: 8, una secuencia de aminoácidos alternativa que comprende el dominio V de RAGE humano; SEQ ID NO: 9, un fragmento N-terminal del dominio V de RAGE humano; SEQ ID NO: 10, un fragmento N-terminal alternativo del dominio V de RAGE humano; SEQ ID NO: 11, la secuencia de aminoácidos para los aminoácidos 124-221 de RAGE humano; SEQ ID NO: 12, la secuencia de aminoácidos para los aminoácidos 227-317 de RAGE humano; SEQ ID NO: 13, la secuencia de aminoácidos para los aminoácidos 23-123 de RAGE humano; panel E, SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácidos para los aminoácidos 24-123 de RAGE humano; SEQ ID NO: 15, la secuencia de aminoácidos para los aminoácidos 23-136 de RAGE humano; SEQ ID NO: 16, la secuencia de aminoácidos para los aminoácidos 24-136 de RAGE humano; SEQ ID NO: 17, la secuencia de aminoácidos para los aminoácidos 23-226 de RAGE humano; SEQ ID NO: 18, la secuencia de aminoácidos para los aminoácidos 24-226 de RAGE humano; panel F, SEQ ID NO: 19, la secuencia de aminoácidos para los aminoácidos 23-251 de RAGE humano; SEQ ID NO: 20, la secuencia de aminoácidos para los aminoácidos 24-251 de RAGE humano; SEQ ID NO: 21, un ligador interdominio de RAGE; SEQ ID NO: 22, un segundo ligador interdominio de RAGE; SEQ ID NO: 23, un tercer ligador interdominio de RAGE; SEQ ID NO: 24, un cuarto ligador interdominio de RAGE; panel G, SEQ ID NO: 25, ADN que codifica para los aminoácidos 1-118 de RAGE humano; SEQ ID NO: 26, ADN que codifica para los aminoácidos 1-123 de RAGE humano; y SEQ ID NO: 27, ADN que codifica para los aminoácidos 1-136 de RAGE humano; Panel H, SEQ ID NO: 28, ADN que codifica para los aminoácidos 1-230 de RAGE humano; y SEQ ID NO: 29, ADN que codifica para los aminoácidos 1-251 de RAGE humano; panel I, SEQ ID NO: 38, una secuencia de aminoácidos parcial para los dominios C_{H2} y C_{H3} de IgG humana; SEQ ID NO: 39, ADN que codifica para una porción de los dominios C_{H2} y C_{H3} humanos de IgG humana; SEQ ID NO: 40, una secuencia de aminoácidos para los dominios C_{H2} y C_{H3} de IgG humana; panel J, SEQ ID NO: 41, un ADN que codifica para los dominios C_{H2} y C_{H3} de IgG humana; SEQ ID NO: 42, una secuencia de aminoácidos para el dominio C_{H2} de IgG humana; SEQ ID NO: 43, una secuencia de aminoácidos para el dominio C_{H3} de IgG humana; y SEQ ID NO: 44, un quinto ligador interdominio de RAGE.

La figura 2 muestra la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 30) de una región que codifica par una proteína de fusión de RAGE (TTP-4000) según una realización de la presente invención. La secuencia codificante 1-753 destacada en negrita codifica para una secuencia de proteína N-terminal de RAGE mientras que la secuencia 754-1386 codifica para una secuencia de proteína Fc de IgG humana (γ 1).

La figura 3 muestra la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 31) de una región que codifica para una proteína de fusión de RAGE alternativa (TTP-3000) según una realización de la presente invención. La secuencia codificante 1-408 destacada en negrita codifica para una secuencia de proteína N-terminal de RAGE, mientras que la secuencia 409-1041 codifica para una secuencia de proteína Fc de IgG humana (γ 1).

La figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos, SEQ ID NO: 32 (TTP-4000), SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34, que codifican cada una para una proteína de fusión de RAGE de cuatro dominios según realizaciones alternativas de la presente invención. La secuencia de RAGE está destacada con letras en negrita.

La figura 5 muestra las secuencias de aminoácidos, SEQ ID NO: 35 (TTP-3000), SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37, que codifican cada una para una proteína de fusión de RAGE de tres dominios según realizaciones alternativas de la presente invención. La secuencia de RAGE está destacada con letras en negrita.

La figura 6, panel A, muestra una comparación de los dominios de proteína en RAGE humano y proteína Fc de Ig gamma-1 humana, y los puntos de escisión usados para preparar TTP-3000 (en la posición 136) y TTP-4000 (en la posición 251) según realizaciones alternativas de la presente invención; y el panel B muestra la estructura de dominios para TTP-3000 y TTP-4000 según realizaciones alternativas de la presente invención.

La figura 7 muestra los resultados de un ensayo de unión *in vitro* para RAGEs y las proteínas de fusión de RAGE TTP-4000 (TT4) y TTP-3000 (TT3), a los ligandos de RAGE amiloide beta (A-beta), S100b (S100) y anfoterina (Ampho), según una realización de la presente invención.

La figura 8 muestra los resultados de un ensayo de unión *in vitro* para la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 (TT4) ("proteína") a amiloide beta en comparación con un control negativo que sólo incluye los reactivos de inmunodetección ("complejo solo"), y el antagonismo de tal unión por un antagonista de RAGE ("ligando de RAGE") según una realización de la presente invención.

La figura 9 muestra los resultados de un ensayo de unión *in vitro* para la proteína de fusión de RAGE TTP-3000 (TT3) ("proteína") a amiloide beta en comparación con un control negativo que sólo incluye los reactivos de inmunodetección ("complejo solo"), y el antagonismo de tal unión por un antagonista de RAGE ("ligando de RAGE") según una realización de la presente invención.

La figura 10 muestra los resultados de un ensayo basado en células que mide la inhibición de la producción de TNF- α inducida por S100b-RAGE mediante las proteínas de fusión de RAGE TTP-3000 (TT3) y TTP-4000 (TT4), y RAGEs según una realización de la presente invención.

La figura 11 muestra un perfil farmacocinético para la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 según una realización de la presente invención en el que cada curva representa un animal diferente en las mismas condiciones experimentales.

La figura 12 muestra los niveles relativos de liberación de TNF- α a partir de células THP-1 debida a la estimulación mediante la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 y estimulación mediante IgG humana como una medida de una respuesta inflamatoria según una realización de la presente invención.

La figura 13 muestra el uso de la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 para reducir la reestenosis en animales diabéticos según realizaciones alternativas de la presente invención, en la que el panel A muestra que la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 reducía la razón íntima/media en comparación con un control negativo (IgG), y el panel B muestra que la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 reducía la proliferación de células de músculo liso vascular de una manera sensible a la dosis.

La figura 14 muestra el uso de la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 para reducir la formación de amiloide y la disfunción cognitiva en animales enfermedad de Alzheimer (EA) según realizaciones alternativas de la presente invención en la que el panel A muestra que la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 reducía la carga de amiloide en el cerebro, y el panel B muestra que la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 mejoraba la función cognitiva.

La figura 15 muestra curvas de unión de saturación con TTP-4000 a diversos ligandos de RAGE conocidos inmovilizados según una realización de la presente invención.

Descripción detallada

Para los fines de esta memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario, debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de componentes, condiciones de reacción y etc. usados en la memoria descriptiva están modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener por la presente invención. Por lo menos, y no como intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos notificados y aplicando técnicas de redondeo habituales.

A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que exponen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se notifican de manera tan precisa como sea posible. Sin embargo cualquier valor numérico contiene inherentemente determinados errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba. Además, debe entenderse que todos los intervalos dados a conocer en el presente documento abarcan todos y cada uno de los subintervalos contenidos en los mismos. Por ejemplo, debe considerarse que un intervalo indicado de “1 a 10” incluye todos y cada uno de los subintervalos entre (e incluidos) el valor mínimo de 1 y el valor máximo de 10; es decir, todos los subintervalos que comienzan con un valor mínimo de 1 o más, por ejemplo de 1 a 6,1, y que terminan con un valor máximo de 10 o menos, por ejemplo, de 5,5 a 10. Adicionalmente, cualquier referencia a que “se incorpora en el presente documento” debe entenderse que se incorpora en su totalidad.

Se indica además que, tal como se usa en esta memoria descriptiva, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que se limite expresa e inequívocamente a un referente. El término “o” se usa de manera intercambiable con el término “y/o” a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Además, los términos “porción” y “fragmento” se usan de manera intercambiable para referirse a partes de un polipéptido, ácido nucleico u otro constructo molecular.

Tal como se usa en el presente documento, el término “en el sentido N-terminal/de 5'” se refiere a un residuo que está en posición N-terminal con respecto a un segundo residuo cuando la molécula es una proteína, o en 5' con respecto a un segundo residuo cuando la molécula es un ácido nucleico. También tal como se usa en el presente documento, el término “en el sentido C-terminal/de 3'” se refiere a un residuo que está en posición C-terminal con respecto a un segundo residuo cuando la molécula es una proteína, o en 3' con respecto a un segundo residuo cuando la molécula es un ácido nucleico.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica. Se remite particularmente a los profesionales sanitarios a Current Protocols in Molecular Biology (Ansubel) para definiciones y términos de la técnica. Las abreviaturas para los residuos de aminoácido son los códigos de 3 letras y/o 1 letra convencionales usados en la técnica para referirse a uno de los 20 L-aminoácidos comunes.

Un “ácido nucleico” es un polinucleótido tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). El

término se usa para incluir ácidos nucleicos monocatenarios, ácidos nucleicos bicatenarios y ARN y ADN preparado a partir de análogos de nucleótido o nucleósido.

El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede usarse para transportar una segunda molécula de ácido nucleico al interior de una célula. En una realización, el vector permite la replicación de secuencias de ADN insertadas en el vector. El vector puede comprender un promotor para potenciar la expresión de la molécula de ácido nucleico en al menos algunas células huésped. Los vectores pueden replicarse de manera autónoma (extracromosómica) o pueden integrarse en un cromosoma de la célula huésped. En una realización, el vector puede comprender un vector de expresión que puede producir una proteína derivada de al menos parte de una secuencia de ácido nucleico insertada en el vector.

Tal como se conoce en la técnica, puede describirse que condiciones para hibridar secuencias de ácido nucleico entre sí oscilan entre rigurosidad baja y alta. Generalmente, condiciones de hibridación altamente rigurosas se refieren a híbridos de lavado en tampón de sal bajo a altas temperaturas. La hibridación puede ser para filtrar el ADN unido usando disoluciones de hibridación convencionales en la técnica tales como NaHPO_4 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, a 65°C, y lavar en NaHPO_4 0,25 M, SDS al 3,5% seguido por lavar en 0,1 x SSC/SDS al 0,1% a una temperatura que oscila entre temperatura ambiente y 68°C dependiendo de la longitud de la sonda (véase por ejemplo Ausubel, F.M. *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed., capítulo 2, John Wiley & Sons, N.Y.). Por ejemplo, un lavado de alta rigurosidad comprende lavar en 6x SSC/pirofosfato de sodio 0,05% a 37°C para una sonda de oligonucleótido de 14 bases o a 48°C para una sonda de oligonucleótido de 17 bases o a 55°C para una sonda de oligonucleótido de 20 bases o a 60°C para una sonda de oligonucleótido de 25 bases o a 65°C para una sonda de nucleótido de aproximadamente 250 nucleótidos de longitud. Las sondas de ácido nucleico pueden marcarse con radionucleótidos mediante marcaje de extremos un extremo con, por ejemplo, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, o incorporación de nucleótidos radiomarcados tales como $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ mediante marcaje con cebadores aleatorios. Alternativamente, las sondas pueden marcarse mediante la incorporación de nucleótidos biotinilados o marcados con fluoresceína, y detectarse la sonda usando estreptavidina o anticuerpos anti-fluoresceína.

Tal como se usa en el presente documento, “moléculas orgánicas pequeñas” son moléculas de peso molecular inferior a 2.000 Daltons que contienen al menos un átomo de carbono.

“Polipéptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en el presente documento para describir moléculas de proteína que pueden comprender proteínas o bien parciales o bien de longitud completa.

El término “proteína de fusión” se refiere a una proteína o un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de dos o más proteínas. La proteína de fusión también puede incluir regiones de unión de aminoácidos entre porciones de aminoácidos derivadas de proteínas separadas.

Tal como se usa en el presente documento, un “polipéptido distinto de RAGE” es cualquier polipéptido que no se deriva de RAGE o un fragmento del mismo. Tales polipéptidos distintos de RAGE incluyen péptidos de inmunoglobulina, polipéptidos de dimerización, polipéptidos de estabilización, péptidos anfífilos o polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que proporcionan “etiquetas” para la selección como diana o purificación de la proteína.

Tal como se usa en el presente documento, los “péptidos de inmunoglobulina” pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma. En una realización, la porción de la cadena pesada puede ser el fragmento Fc o una porción del mismo. Tal como se usa en el presente documento, el fragmento Fc comprende el polipéptido bisagra de cadena pesada, y los dominios $\text{C}_\text{H}2$ y $\text{C}_\text{H}3$ de la cadena pesada de una inmunoglobulina, en forma o bien monomérica o bien dimérica. O, el fragmento Fc y $\text{C}_\text{H}1$ pueden usarse como polipéptido de inmunoglobulina. La cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los isotipos de cadena pesada conocidos: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ) o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los subtipos de cadena pesada conocidos: IgG1 ($\gamma 1$), IgG2 ($\gamma 2$), IgG3 ($\gamma 3$), IgG4 ($\gamma 4$), IgA1 ($\alpha 1$), IgA2 ($\alpha 2$), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. Un ejemplo de actividad biológica que puede alterarse incluye reducción de la capacidad de un isotipo para unirse a algunos receptores de Fc tal como por ejemplo mediante modificación de la región bisagra.

Los términos “identidad” o “porcentaje de identidad” se refieren a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de ácido nucleico. El porcentaje de identidad puede determinarse alineando dos secuencias y se refiere al número de residuos idénticos (es decir, aminoácido o nucleótido) en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. La alineación y comparación de secuencias puede realizarse usando los algoritmos convencionales en la técnica (por ejemplo Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443; Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:2444) o mediante versiones informatizadas de estos algoritmos (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI) disponibles públicamente como BLAST y FASTA. Además, puede usarse ENTREZ, disponible a través de los National Institutes of Health, Bethesda MD, para la comparación de secuencias. En una realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias puede determinarse

usando GCG con un peso de hueco de 1, de manera que cada hueco de aminoácido está ponderado como si fuera un único apareamiento erróneo de aminoácido entre las dos secuencias.

Tal como se usa en el presente documento, el término “residuos conservados” se refiere a aminoácidos que son iguales a lo largo de una pluralidad de proteínas que tienen la misma estructura y/o función. Una región de residuos conservados puede ser importante para la estructura o función de la proteína. Por tanto, los residuos conservados contiguos tal como se identifican en una proteína tridimensional pueden ser importantes para la estructura o función de la proteína. Para encontrar residuos conservados o regiones conservadas de estructura 3-D, puede realizarse una comparación de secuencias para proteínas iguales o similares de diferentes especies, o de individuos de la misma especie.

Tal como se usa en el presente documento, el término “homólogo” significa un polipéptido que tiene un grado de homología con la secuencia de aminoácidos de tipo natural. Pueden realizarse comparaciones de homología a simple vista o, más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el porcentaje de homología entre dos o más secuencias (por ejemplo Wilbur, W. J. y Lipman, D. J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:726-730). Por ejemplo, pueden tomarse secuencias homólogas para que incluyan secuencias de aminoácidos que en realizaciones alternativas son al menos idénticas en un 75%, idénticas en un 85%, idénticas en un 90%, idénticas en un 95% o idénticas en un 98% entre sí.

Tal como se usa en el presente documento, un “dominio” de polipéptido o proteína comprende una región a lo largo de un polipéptido o una proteína que comprende una unidad independiente. Pueden definirse dominios en cuanto a estructura, secuencia y/o actividad biológica. En una realización, un dominio de polipéptido puede comprender una región de una proteína que se pliega de una manera que es sustancialmente independiente del resto de la proteína. Pueden identificarse dominios usando bases de datos de dominios tales como, pero sin limitarse a PFAM, PRODOM, PROSITE, BLOCKS, PRINTS, SBASE, ISREC PROFILES, SAMRT y PROCLASS.

Tal como se usa en el presente documento, “dominio de inmunoglobulina” es una secuencia de aminoácidos que es estructuralmente homóloga, o idéntica a, un dominio de una inmunoglobulina. La longitud de la secuencia de aminoácidos de un dominio de inmunoglobulina puede ser de cualquier longitud. En una realización, un dominio de inmunoglobulina puede ser de menos de 250 aminoácidos. En una realización de ejemplo, un dominio de inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 80-150 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, la región variable y las regiones C_{H1}, C_{H2} y C_{H3} de una IgG son cada una dominios de inmunoglobulina. En otro ejemplo, las regiones variables, las C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4} de una IgM son cada una dominios de inmunoglobulina.

Tal como se usa en el presente documento, un “dominio de inmunoglobulina de RAGE” es una secuencia de aminoácidos de la proteína RAGE que es estructuralmente homóloga, o idéntica a, un dominio de una inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio de inmunoglobulina de RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, el dominio 1 de tipo C2 similar a Ig de RAGE (“dominio C1”) o el dominio 2 de tipo C2 similar a Ig de RAGE (“dominio C2”).

Tal como se usa en el presente documento, un “ligador interdominio” comprende un polipéptido que une dos dominios entre sí. Una región bisagra Fc es un ejemplo de un ligador interdominio en una IgG.

Tal como se usa en el presente documento, “unido directamente” identifica una unión covalente entre dos grupos diferentes (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico, polipéptidos, dominios de polipéptido) que no tiene ningún átomo intermedio entre los dos grupos que están uniéndose.

Tal como se usa en el presente documento, “dominio de unión a ligando” se refiere a un dominio de una proteína responsable de la unión a un ligando. El término dominio de unión a ligando incluye homólogos de un dominio de unión a ligando o porciones del mismo. A este respecto, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos deliberadas en el sitio de unión a ligando basándose en la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad o hidrofilia de los residuos, siempre que se conserve la especificidad de unión del dominio de unión a ligando.

Tal como se usa en el presente documento, un “sitio de unión a ligando” comprende residuos en una proteína que interaccionan directamente con un ligando, o residuos implicados en el posicionamiento del ligando en proximidad estrecha a los residuos que interaccionan directamente con el ligando. La interacción de residuos en el sitio de unión a ligando puede definirse por la proximidad espacial de los residuos a un ligando en el modelo o estructura. El término sitio de unión a ligando incluye homólogos de un sitio de unión a ligando, o porciones del mismo. A este respecto, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos deliberadas en el sitio de unión a ligando basándose en la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad o hidrofilia de los residuos, siempre que se conserve la especificidad de unión del sitio de unión a ligando. Un sitio de unión a ligando puede existir en uno o más dominios de unión a ligando de una proteína o un polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, el término “interaccionar” se refiere a una condición de proximidad entre un ligando o compuesto, o porciones o fragmentos del mismo, y una porción de una segunda molécula de interés. La

interacción puede ser no covalente, por ejemplo, como resultado de enlaces por puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals o interacciones electrostáticas o hidrófobas, o puede ser covalente.

Tal como se usa en el presente documento, un “ligando” se refiere a una molécula o un compuesto o una entidad que interacciona con un sitio de unión a ligando, incluyendo sustratos o análogos o partes de los mismos. Tal como se describe en el presente documento, el término “ligando” puede referirse a compuestos que se unen a la proteína de interés. Un ligando puede ser un agonista, un antagonista o un modulador. O, un ligando puede no tener un efecto biológico. O, un ligando puede bloquear la unión de otros ligandos inhibiendo de esta manera un efecto biológico. Los ligandos pueden incluir, pero no se limitan a, inhibidores de molécula pequeña. Estas moléculas pequeñas pueden incluir péptidos, peptidomiméticos, compuestos orgánicos y similares. Los ligandos también pueden incluir polipéptidos y/o proteínas.

Tal como se usa en el presente documento, un “compuesto modulador” se refiere a una molécula que cambia o altera la actividad biológica de una molécula de interés. Un compuesto modulador puede aumentar o disminuir la actividad, o cambiar las características físicas o químicas o las propiedades funcionales o inmunológicas, de la molécula de interés. Para RAGE, un compuesto modulador puede aumentar o disminuir la actividad, o cambiar las características o las propiedades funcionales o inmunológicas del RAGE, o una porción del mismo. Un compuesto modulador puede incluir péptidos naturales y/o sintetizados químicamente o artificiales, péptidos modificados (por ejemplo, fosfopéptidos), anticuerpos, hidratos de carbono, monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, glicolípidos, compuestos heterocíclicos, nucleósidos o nucleótidos o partes de los mismos y moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas. Un compuesto modulador puede ser un compuesto fisiológico endógeno o puede ser un compuesto natural o sintético. O, el compuesto modulador puede ser una molécula orgánica pequeña. El término “compuesto modulador” también incluye un compuesto o ligando modificado químicamente, e incluye isómeros y formas racémicas.

Un “agonista” comprende un compuesto que se une a un receptor para formar un complejo que provoca una respuesta farmacológica específica para el receptor implicado.

Un “antagonista” comprende un compuesto que se une a un agonista o a un receptor para formar un complejo que no da lugar a una respuesta farmacológica sustancial y que puede inhibir la respuesta biológica inducida por un agonista.

Por tanto, los agonistas de RAGE puede unirse a RAGE y estimular procesos celulares mediados por RAGE y los antagonistas de RAGE pueden inhibir que los procesos mediados por RAGE se estimulen por un agonista de RAGE. Por ejemplo, en una realización, el proceso celular estimulado por agonistas de RAGE comprende la activación de la transcripción del gen de TNF- α .

El término “miméticos de péptido” se refiere a estructuras que sirven como sustitutos para péptidos en interacciones entre moléculas (Morgan *et al.*, 1989, Ann. Reports Med. Chem., 24:243-252). Los miméticos de péptido pueden incluir estructuras sintéticas que pueden contener o no uniones de péptido y/o aminoácidos pero que conservan las características estructurales y funcionales de un péptido, o agonista o antagonista. Los miméticos de péptido también incluyen peptoides, oligopeptoides (Simon *et al.*, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:9367); y bibliotecas de péptidos que contienen péptidos de una longitud diseñada que representan todas las posibles secuencias de aminoácidos que corresponden a un péptido, o agonista o antagonista de la invención.

El término “tratar” se refiere a mejorar un síntoma de una enfermedad o un trastorno y puede comprender curar el trastorno, previniendo sustancialmente la aparición del trastorno, o mejorando el estado del sujeto. El término “tratamiento” tal como se usa en el presente documento, se refiere al espectro completo de tratamientos para un trastorno dado que padece el paciente, incluyendo alivio de un síntoma o la mayoría de los síntomas que resultan de ese trastorno, una cura para el trastorno particular o prevención de la aparición del trastorno.

Tal como se usa en el presente documento, el término “CE50” se define como la concentración de un agente que da como resultado el 50% de un efecto biológico medido. Por ejemplo, la CE50 de un agente terapéutico que tiene un efecto biológico medible puede comprender el valor al que el agente presenta el 50% del efecto biológico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “CI50” se define como la concentración de un agente que da como resultado una inhibición del 50% de un efecto medido. Por ejemplo, la CI50 de un antagonista de la unión a RAGE puede comprender el valor al que el antagonista reduce la unión del ligando al sitio de unión a ligando de RAGE en un 50%.

Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad eficaz” significa la cantidad de un agente que es eficaz para producir un efecto deseado en un sujeto. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” indica la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta terapéutica de un animal o ser humano que está buscándose. La dosis real que comprende la cantidad eficaz puede depender de la vía de administración, el tamaño y la salud del sujeto, el trastorno que está tratándose, y similares.

El término “portador farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en el presente documento puede referirse a compuestos y composiciones que son adecuados para su uso en sujetos humanos o animales, tales como por ejemplo, para composiciones terapéuticas administradas para el tratamiento de un trastorno o enfermedad mediado por RAGE.

El término “composición farmacéutica” se usa en el presente documento para indicar una composición que puede administrarse a un huésped mamífero, por ejemplo, por vía oral, por vía parenteral, por vía tópica, mediante pulverización de inhalación, por vía intranasal o por vía rectal, en formulaciones de dosificación unitaria que contienen portadores, diluyentes, adyuvantes, vehículos y similares no tóxicos convencionales.

El término “parenteral” tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intracisternal o técnicas de infusión.

Proteínas de fusión de RAGE

Las realizaciones de la presente invención comprenden proteínas de fusión de RAGE, métodos de preparación de tales proteínas de fusión y el uso de tales proteínas de fusión. La presente invención puede realizarse de una variedad de modos.

Por ejemplo, realizaciones de la presente invención proporcionan proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de RAGE unido a un segundo polipéptido distinto de RAGE. La proteína de fusión comprende un sitio de unión a ligando de RAGE. En una realización, el sitio de unión a ligando comprende el dominio más N-terminal de la proteína de fusión. El sitio de unión a ligando de RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión a ligando de RAGE comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma.

El polipéptido de RAGE está unido a un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción (por ejemplo, un fragmento de la misma) de un dominio de inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina comprende al menos una porción de al menos uno de los dominios C_H2 o C_H3 de una IgG humana.

Una proteína o un polipéptido de RAGE puede comprender proteína RAGE humana de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) o un fragmento de RAGE humano. Tal como se usa en el presente documento, un fragmento de un polipéptido de RAGE tiene al menos 5 aminoácidos de longitud, puede ser mayor de 30 aminoácidos de longitud, pero es menor que la secuencia de aminoácidos completa. En realizaciones alternativas, el polipéptido de RAGE puede comprender una secuencia que es idéntica en un 70% o en un 80% o en un 85% o en un 90% a RAGE humano, o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido de RAGE puede comprender RAGE humano, o un fragmento del mismo, con glicina como primer residuo en vez de metionina (véase por ejemplo, Neeper *et al.*, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGE de longitud completa con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3) (figuras 1A y 1B) o una porción de esa secuencia de aminoácidos.

Las proteínas de fusión de la presente invención también pueden comprender RAGEs (por ejemplo, SEQ ID NO: 4), un polipéptido idéntico en un 90% a RAGEs, o un fragmento de RAGEs. Tal como se usa en el presente documento, RAGEs es la proteína RAGE que no incluye la región transmembrana o la cola citoplasmática (Park *et al.*, Nature Med., 4:1025-1031 (1998)). Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender RAGEs humano, o un fragmento del mismo, con glicina como el primer residuo en vez de una metionina (véase por ejemplo, Neeper *et al.*, (1992)). O, un polipéptido de RAGE puede comprender RAGEs humano con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) (figura 1C) o una porción de esa secuencia de aminoácidos.

En otras realizaciones, la proteína RAGE puede comprender un dominio V de RAGE (por ejemplo, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; figura 1D) (Neeper *et al.*, (1992); Schmidt *et al.* (1997)). O, puede usarse una secuencia idéntica en un 90% al dominio V de RAGE o un fragmento del mismo.

O, la proteína RAGE puede comprender un fragmento del dominio V de RAGE (por ejemplo, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, figura 1D). En una realización la proteína RAGE puede comprender un sitio de unión a ligando. En una realización, el sitio de unión a ligando puede comprender SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma. Aún en otra realización, el fragmento de RAGE es un péptido sintético.

Por tanto, el polipéptido de RAGE usado en las proteínas de fusión de la presente invención puede comprender un fragmento de RAGE de longitud completa. Tal como se conoce en la técnica, RAGE comprende tres dominios de polipéptido similares a inmunoglobulina, el dominio V y los dominios C1 y C2 cada uno unido al otro por un ligador interdominio. RAGE de longitud completa también incluye un polipéptido transmembrana y una cola citoplasmática en el sentido C-terminal del dominio C2 y unido al dominio C2.

En una realización, el polipéptido de RAGE no incluye ningún residuo de secuencia señal. La secuencia señal de RAGE puede comprender o bien los residuos 1-22 o bien los residuos 1-23 de RAGE de longitud completa.

Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-116 de RAGE humano (SEQ ID NO: 7) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-116 de RAGE humano (SEQ ID NO: 8) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V de RAGE. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 124-221 de RAGE humano (SEQ ID NO: 11) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio C1 de RAGE. En otra realización, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 227-317 de RAGE humano (SEQ ID NO: 12) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio C2 de RAGE. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-123 de RAGE humano (SEQ ID NO: 13) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-123 de RAGE humano (SEQ ID NO: 14) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V de RAGE y un ligador interdominio en el sentido C-terminal. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-226 de RAGE humano (SEQ ID NO: 17) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-226 de RAGE humano (SEQ ID NO: 18) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V, el dominio C1 y el ligador interdominio que une estos dos dominios. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 5) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o 24-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 6) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente a RAGEs (es decir, que codifica para los dominios V, C1 y C2 y ligadores interdominio). O, pueden usarse fragmentos de cada una de estas secuencias.

La proteína de fusión puede incluir varios tipos de péptidos que no se derivan de RAGE o un fragmento del mismo. El segundo polipéptido de la proteína de fusión puede comprender un polipéptido derivado de una inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido de inmunoglobulina puede comprender una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción (es decir, fragmento) de la misma. Por ejemplo, el fragmento de cadena pesada puede comprender un polipéptido derivado del fragmento Fc de una inmunoglobulina, en el que el fragmento Fc comprende el polipéptido bisagra de cadena pesada, y los dominios C_{H2} y C_{H3} de la cadena pesada de inmunoglobulina como monómero. La cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los isotipos conocidos de cadena pesada: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ε) o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los subtipos conocidos de cadena pesada: IgG1 (γ1), IgG2 (γ2), IgG3 (γ3), IgG4 (γ4), IgA1 (α1), IgA2 (α2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. El segundo polipéptido puede comprender los dominios C_{H2} y C_{H3} de una IgG1 humana o porciones de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como realizaciones de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_{H2} y C_{H3} de una IgG1 humana o una porción de los mismos pueden comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

La porción Fc de la cadena de inmunoglobulina puede ser proinflamatoria *in vivo*. Por tanto, la proteína de fusión de RAGE de la presente invención comprende un ligador interdominio derivado de RAGE en vez de un polipéptido bisagra interdominio derivado de una inmunoglobulina.

Por tanto en una realización, la proteína de fusión puede comprender además un polipéptido de RAGE unido directamente a un polipéptido que comprende un dominio C_{H2} de una inmunoglobulina, o un fragmento o una porción del dominio C_{H2} de una inmunoglobulina. En una realización, el dominio C_{H2}, o un fragmento del mismo comprende SEQ ID NO: 42. El polipéptido de RAGE comprende un sitio de unión a ligando. El sitio de unión a ligando de RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión a ligando de RAGE comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma.

El polipéptido de RAGE usado en las proteínas de fusión de la presente invención comprende un dominio de inmunoglobulina de RAGE. Adicionalmente, el fragmento de RAGE comprende un ligador interdominio. El polipéptido de RAGE comprende un dominio de inmunoglobulina de RAGE unido a un ligador interdominio en el sentido C-terminal (es decir, más cercano al extremo C-terminal). Aún en otra realización, el polipéptido de RAGE puede comprender dos (o más) dominios de inmunoglobulina de RAGE cada uno unido al otro mediante un ligador interdominio. El polipéptido de RAGE puede comprender además múltiples dominios de inmunoglobulina de RAGE unidos entre sí por uno o más ligadores interdominio y que tienen un ligador interdominio terminal unido al dominio de inmunoglobulina de RAGE N-terminal y/o el dominio de inmunoglobulina C-terminal. Combinaciones adicionales de dominios de inmunoglobulina de RAGE y ligadores interdominio están dentro del alcance de la presente invención.

El polipéptido de RAGE comprende un ligador interdominio de RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE de manera que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido N-terminal del ligador interdominio, y el aminoácido C-terminal del ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio C_{H2} de una inmunoglobulina, o un fragmento del mismo. El polipéptido que comprende un dominio C_{H2} de una inmunoglobulina puede comprender los dominios C_{H2} y C_{H3} de una IgG1 humana o una porción de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_{H2} y C_{H3}, o una porción de los mismos, de una IgG1 humana puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

Tal como se describió anteriormente, la proteína de fusión de la presente invención puede comprender un único dominio o múltiples dominios de RAGE. Además, el polipéptido de RAGE que comprende un ligador interdominio unido a un dominio de polipéptido de RAGE puede comprender un fragmento de proteína RAGE de longitud completa. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 15) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma o los aminoácidos 24-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 16) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma correspondiente al dominio V de RAGE y un ligador interdominio en el sentido C-terminal. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 19) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 20) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V, el dominio C1, el ligador interdominio que une estos dos dominios y un segundo ligador interdominio en el sentido C-terminal de C1.

Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede comprender dos dominios de inmunoglobulina derivados de la proteína RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. La proteína de fusión puede comprender un primer dominio de inmunoglobulina de RAGE y un primer ligador interdominio de RAGE unido a un segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE y un segundo ligador interdominio de RAGE, de manera que el aminoácido N-terminal del primer ligador interdominio está unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de inmunoglobulina de RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido C-terminal del primer ligador interdominio, el aminoácido N-terminal del segundo ligador interdominio está unido al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE y el aminoácido C-terminal del segundo ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal del dominio de inmunoglobulina C_H2. En una realización, una proteína de fusión de RAGE de cuatro dominios puede comprender SEQ ID NO: 32. En realizaciones alternativas, una proteína de fusión de RAGE de cuatro dominios comprende SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34.

Alternativamente, una proteína de fusión de tres dominios puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un único dominio de inmunoglobulina de RAGE unido por medio de un ligador interdominio de RAGE al aminoácido N-terminal de un dominio de inmunoglobulina C_H2 o una porción de un dominio de inmunoglobulina C_H2. En una realización, una proteína de fusión de RAGE de tres dominios puede comprender SEQ ID NO: 35. En realizaciones alternativas, una proteína de fusión de RAGE de tres dominios puede comprender SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37.

Un fragmento de ligador interdominio de RAGE puede comprender una secuencia de péptido que se encuentra de manera natural en el sentido C-terminal de, y por tanto, unida a, un dominio de inmunoglobulina de RAGE. Por ejemplo, para el dominio V de RAGE, el ligador interdominio puede comprender secuencias de aminoácidos que se encuentran de manera natural en el sentido C-terminal del dominio V. En una realización, el ligador puede comprender SEQ ID NO: 21, correspondiente a los aminoácidos 117-123 de RAGE de longitud completa. O, el ligador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia de RAGE natural. Por ejemplo, puede usarse un ligador interdominio que comprende varios aminoácidos (por ejemplo, 1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos) en el sentido N-terminal y en el sentido C-terminal de SEQ ID NO: 21. Por tanto, en una realización, el ligador interdominio comprende SEQ ID NO: 23 que comprende los aminoácidos 117-136 de RAGE de longitud completa. O, pueden usarse fragmentos de SEQ ID NO: 21 delecionando, por ejemplo, 1, 2 ó 3 aminoácidos de cualquier extremo del ligador. En realizaciones alternativas, el ligador puede comprender una secuencia que es idéntica en un 70%, o idéntica en un 80%, o idéntica en un 90% a SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 23.

Para el dominio C1 de RAGE, el ligador puede comprender una secuencia de péptido que se encuentra de manera natural en el sentido C-terminal del dominio C1. En una realización, el ligador puede comprender SEQ ID NO: 22, correspondiente a los aminoácidos 222-251 de RAGE de longitud completa. O, el ligador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia de RAGE natural. Por ejemplo, puede usarse un ligador que comprende varios (1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos) aminoácidos en el sentido N-terminal y en el sentido C-terminal de SEQ ID NO: 22. O, pueden usarse fragmentos de SEQ ID NO: 22, delecionando por ejemplo, 1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos de cualquier extremo del ligador. Por ejemplo, en una realización, un ligador interdominio de RAGE puede comprender SEQ ID NO: 24, correspondiente a los aminoácidos 222-226. O un ligador interdominio puede comprender SEQ ID NO: 44, correspondiente a los aminoácidos 318-342 de RAGE.

Métodos de producción de proteínas de fusión de RAGE

La presente invención también comprende un método para preparar una proteína de fusión de RAGE. Por tanto, en una realización, la presente invención comprende un método de preparación de una proteína de fusión de RAGE que comprende la etapa de unir covalentemente un polipéptido de RAGE unido a un segundo polipéptido distinto de RAGE en el que el polipéptido de RAGE comprende un sitio de unión a ligando de RAGE. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE unido y el segundo polipéptido distinto de RAGE pueden codificarse por un constructo de ADN recombinante. El método puede comprender además la etapa de incorporar el constructo de ADN en un vector de expresión. Además, el método puede comprender la etapa de insertar el vector de expresión en una célula huésped.

- Por ejemplo, realizaciones de la presente invención proporcionan proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de RAGE unido a un segundo polipéptido distinto de RAGE. La proteína de fusión comprende un sitio de unión a ligando de RAGE. En una realización, el sitio de unión a ligando comprende el dominio más N-terminal de la proteína de fusión. El sitio de unión a ligando de RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión a ligando de RAGE comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma.
- El polipéptido de RAGE está unido a un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción (por ejemplo, un fragmento de la misma) de un dominio de inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina comprende al menos una porción de al menos uno de los dominios C_H2 o C_H3 de una IgG humana.
- La proteína de fusión puede modificarse mediante ingeniería genética mediante técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, en una realización, la presente invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica para un polipéptido de RAGE unido a un segundo polipéptido distinto de RAGE. El polipéptido de RAGE comprende un sitio de unión a ligando de RAGE.
- La proteína o el polipéptido de RAGE puede comprender RAGE humano de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), o un fragmento de RAGE humano. En una realización, el polipéptido de RAGE no incluye ningún residuo de secuencia señal. La secuencia señal de RAGE puede comprender o bien los residuos 1-22 o bien los residuos 1-23 de RAGE de longitud completa (SEQ ID NO: 1). En realizaciones alternativas, el polipéptido de RAGE puede comprender una secuencia idéntica en un 70% o en un 80% o en un 90% a RAGE humano, o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido de RAGE puede comprender RAGE humano, o un fragmento del mismo, con glicina como primer residuo en vez de metionina (véase por ejemplo, Neeper *et al.*, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGE de longitud completa con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3) (figuras 1A y 1B) o una porción de esa secuencia de aminoácidos. Las proteínas de fusión de la presente invención también pueden comprender RAGEs (por ejemplo, SEQ ID NO: 4), un polipéptido idéntico en un 90% a RAGEs, o un fragmento de RAGEs. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender RAGEs humano, o un fragmento del mismo, con glicina como primer residuo en vez de metionina (véase por ejemplo, Neeper *et al.*, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGEs con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) (figura 1C) o una porción de esa secuencia de aminoácidos. En otras realizaciones, la proteína RAGE puede comprender un dominio V (por ejemplo, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; figura 1D). O, puede usarse una secuencia idéntica en un 90% al dominio V o un fragmento del mismo. O, la proteína RAGE puede comprender un fragmento de RAGE que comprende una porción del dominio V (por ejemplo, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, figura 1D). En una realización, el sitio de unión a ligando puede comprender SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma. Aún en otra realización, el fragmento de RAGE es un péptido sintético.
- En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende SEQ ID NO: 25 para codificar para los aminoácidos 1-118 de RAGE humano o un fragmento del mismo. Por ejemplo, puede usarse una secuencia que comprende los nucleótidos 1-348 de SEQ ID NO: 25 para codificar para los aminoácidos 1-116 de RAGE humano. O, el ácido nucleico puede comprender SEQ ID NO: 26 para codificar para los aminoácidos 1-123 de RAGE humano. O, el ácido nucleico puede comprender SEQ ID NO: 27 para codificar para los aminoácidos 1-136 de RAGE humano. O, el ácido nucleico puede comprender SEQ ID NO: 28 para codificar para los aminoácidos 1-230 de RAGE humano. O, el ácido nucleico puede comprender SEQ ID NO: 29 para codificar para los aminoácidos 1-251 de RAGE humano. O pueden usarse fragmentos de estas secuencias de ácido nucleico para codificar para fragmentos de polipéptido de RAGE.
- La proteína de fusión puede incluir varios tipos de péptidos que no se derivan de RAGE o un fragmento del mismo. El segundo polipéptido de la proteína de fusión comprende un polipéptido derivado de una inmunoglobulina. La cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los isotipos conocidos de cadena pesada: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ε) o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los subtipos conocidos de cadena pesada: IgG1 (γ1), IgG2 (γ2), IgG3 (γ3), IgG4 (γ4), IgA1 (α1), IgA2 (α2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. El segundo polipéptido puede comprender los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana o una porción de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como realizaciones de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana o una porción de los mismos puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40. El péptido de inmunoglobulina puede codificarse por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.
- La porción Fc de la cadena de inmunoglobulina puede ser proinflamatoria *in vivo*. Por tanto, la proteína de fusión de RAGE de la presente invención comprende un ligador interdominio derivado de RAGE en vez de un polipéptido bisagra interdominio derivado de una inmunoglobulina. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede codificarse por un constructo de ADN recombinante. Además, el método puede comprender la etapa de incorporar el constructo de ADN en un vector de expresión. Además, el método puede comprender transfectar el vector de expresión en el interior de una célula huésped.

Por tanto, en una realización, la presente invención comprende un método de preparación de una proteína de fusión de RAGE que comprende la etapa de unir covalentemente un polipéptido de RAGE a un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina o una porción de un dominio C_H2 de una inmunoglobulina. La proteína de fusión comprende un sitio de unión a ligando de RAGE. El sitio de unión a ligando de RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión a ligando de RAGE comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma.

Por ejemplo, en una realización, la presente invención comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de RAGE unido directamente a un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina, o un fragmento del mismo. En una realización, el dominio C_H2, o un fragmento del mismo, comprende SEQ ID NO: 42. El segundo polipéptido puede comprender los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana. Como realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40. El péptido de inmunoglobulina puede codificarse por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.

El polipéptido de RAGE comprende un ligador interdominio de RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE de manera que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido N-terminal del ligador interdominio, y el aminoácido C-terminal del ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina, o un fragmento del mismo. El polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina puede comprender un polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana o una porción de ambos, o uno cualquiera, de estos dominios. Como realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana, o una porción de los mismos, puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

La proteína de fusión de la presente invención puede comprender un único dominio o múltiples dominios de RAGE. Además, el polipéptido de RAGE que comprende un ligador interdominio unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE puede comprender un fragmento de una proteína RAGE de longitud completa. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede comprender dos dominios de inmunoglobulina derivados de proteína RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. La proteína de fusión puede comprender un primer dominio de inmunoglobulina de RAGE y un primer ligador interdominio unido a un segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE y un segundo ligador interdominio de RAGE, de manera que el aminoácido N-terminal del primer ligador interdominio está unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de inmunoglobulina de RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido C-terminal del primer ligador interdominio, el aminoácido N-terminal del segundo ligador interdominio está unido al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE, y el aminoácido C-terminal del segundo ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal del polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H2 o fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 19) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 20) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V, el dominio C1, el ligador interdominio que une estos dos dominios y un segundo ligador interdominio en el sentido C-terminal de C1. En una realización, un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 30 o un fragmento de la misma puede codificar para una proteína de fusión de RAGE de cuatro dominios.

Alternativamente, una proteína de fusión de tres dominios puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un único dominio de inmunoglobulina de RAGE unido por medio de un ligador interdominio de RAGE al aminoácido N-terminal del polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H2 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 15) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma o los aminoácidos 24-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 16) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma correspondiente al dominio V de RAGE y un ligador interdominio en el sentido C-terminal. En una realización, un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 31 o un fragmento de la misma puede codificar para una proteína de fusión de tres dominios de RAGE.

Un fragmento de ligador interdominio de RAGE puede comprender una secuencia de péptido que se encuentra de manera natural en el sentido C-terminal de, y por tanto, unida a, un dominio de inmunoglobulina de RAGE. Por ejemplo, para el dominio V de RAGE, el ligador interdominio puede comprender secuencias de aminoácidos que se encuentran de manera natural en el sentido C-terminal del dominio V. En una realización, el ligador puede comprender SEQ ID NO: 21, correspondiente a los aminoácidos 117-123 de RAGE de longitud completa. O, el ligador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia de RAGE natural. Por ejemplo, puede usarse un ligador interdominio que comprende varios aminoácidos (por ejemplo, 1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos) en el sentido N-terminal y en el sentido C-terminal de SEQ ID NO: 21. Por tanto, en una realización, el ligador interdominio comprende SEQ ID NO: 23 que comprende los aminoácidos 117-136 de RAGE de longitud

completa. O, pueden usarse fragmentos de SEQ ID NO: 21 delecionando, por ejemplo, 1, 2 ó 3 aminoácidos de cualquier extremo del ligador. En realizaciones alternativas, el ligador puede comprender una secuencia que es idéntica en un 70%, o idéntica en un 80%, o idéntica en un 90% a SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 23.

5 Para el dominio C1 de RAGE, el ligador puede comprender una secuencia de péptido que se encuentra manera natural en el sentido C-terminal del dominio C1. En una realización, el ligador puede comprender SEQ ID NO: 22, correspondiente a los aminoácidos 222-251 de RAGE de longitud completa. O, el ligador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia de RAGE natural. Por ejemplo, puede usarse un ligador que comprende varios (1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos) aminoácidos en el sentido N-terminal y en el sentido C-terminal de SEQ ID NO: 22. O, pueden usarse fragmentos de SEQ ID NO: 22, delecionando por ejemplo, 1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos de cualquier extremo del ligador. Por ejemplo, en una realización, un ligador interdominio de RAGE puede comprender SEQ ID NO: 24, correspondiente a los aminoácidos 222-226. O un ligador interdominio puede comprender SEQ ID NO: 44, correspondiente a los aminoácidos 318-342 de RAGE.

15 El método puede comprender además la etapa de incorporar el constructo de ADN en un vector de expresión. Por tanto, en una realización, la presente invención comprende un vector de expresión que codifica para una proteína de fusión que comprende un polipéptido de RAGE unido directamente a un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina o una porción de un dominio C_H2 de una inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido de RAGE comprende constructos, tales como los descritos en el presente documento, que tienen un ligador interdominio de RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE de manera que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido N-terminal del ligador interdominio, y el aminoácido C-terminal del ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina, o una porción del mismo. Por ejemplo, el vector de expresión usado para transfectar las células puede comprender la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 30, o un fragmento de la misma, o SEQ ID NO: 31, o un fragmento de la misma.

El método puede comprender además la etapa de transfectar una célula con el vector de expresión de la presente invención. Por tanto, en una realización, la presente invención comprende una célula transfectada con el vector de expresión que expresaba la proteína de fusión de RAGE de la presente invención, de manera que la célula expresa una proteína de fusión que comprende un polipéptido de RAGE unido directamente a un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina o una porción de un dominio C_H2 de una inmunoglobulina. El polipéptido de RAGE comprende un constructo, tal como los descritos en el presente documento, que tiene un ligador interdominio de RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE de manera que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido N-terminal del ligador interdominio, y el aminoácido C-terminal del ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina, o una porción del mismo. Por ejemplo, el vector de expresión puede comprender la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 30, o un fragmento de la misma, o SEQ ID NO: 31, o un fragmento de la misma.

40 Por ejemplo, pueden construirse plásmidos para expresar proteínas de fusión de RAGE-Fc de IgG fusionando diferentes longitudes de una secuencia de ADNc en 5' de RAGE humano con una secuencia de ADNc en 3' de Fc de IgG1 humana (γ 1). Las secuencias del casete expresión pueden insertarse en un vector de expresión tal como el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen, CA) usando técnicas recombinantes convencionales.

45 Además, el método puede comprender transfectar el vector de expresión en el interior de una célula huésped. En una realización, el recombinante puede transfectarse en el interior de células de ovario de hámster chino y optimizarse la expresión. En realizaciones alternativas, las células pueden producir de 0,1 a 20 gramos/litro, o de 0,5 a 10 gramos/litro, o aproximadamente 1-2 gramos/litro.

50 Tal como se conoce en la técnica, tales constructos de ácido nucleico pueden modificarse mediante mutación, tal como por ejemplo, mediante amplificación por PCR de un molde de ácido nucleico con cebadores que comprenden la mutación de interés. De este modo, pueden diseñarse polipéptidos que comprenden afinidad variable por ligandos de RAGE. En una realización, las secuencias mutadas pueden ser idénticas en un 90% o más al ADN de partida. Como tal, las variantes pueden incluir secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas (es decir, equivalentes a aproximadamente 20-27°C por debajo de la temperatura de fusión (TF) del dúplex de ADN en sal 1 molar).

La secuencia codificante puede expresarse transfectando el vector de expresión en un huésped apropiado. Por ejemplo, los vectores recombinantes pueden transfectarse de manera estable en el interior de células de ovario de hámster chino (CHO), y seleccionarse y clonarse células que expresan la proteína de fusión. En una realización, las células que expresan el constructo recombinante se seleccionan por resistencia a neomicina codificada por el plásmido aplicando el antibiótico G418. Pueden seleccionarse clones individuales y pueden expandirse clones que expresan altos niveles de proteína recombinante tal como se detecta mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western del sobrenadante celular, y purificarse el producto génico mediante cromatografía de afinidad usando columnas de proteína A.

Se muestran realizaciones de muestra de ácidos nucleicos recombinantes que codifican para las proteínas de fusión de la presente invención en las figuras 2-5. Por ejemplo, tal como se describió anteriormente, la proteína de fusión producida por el constructo de ADN recombinante puede comprender un polipéptido de RAGE unido a un segundo polipéptido distinto de RAGE. La proteína de fusión puede comprender dos dominios derivados de proteína RAGE y dos dominios derivados de una inmunoglobulina. Un ejemplo de constructo de ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión, TTP-4000 (TT4), que tiene este tipo de estructura se muestra en la figura 2 (SEQ ID NO: 30). Tal como se muestra en la figura 2, la secuencia codificante 1-753 (destacada en negrita) codifica para la secuencia de proteína N-terminal de RAGE mientras que la secuencia desde 754-1386 codifica para la secuencia de proteína Fc de IgG.

Cuando se deriva de SEQ ID NO: 30 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, la proteína de fusión puede comprender la secuencia de aminoácidos de cuatro dominios de SEQ ID NO: 32, o el polipéptido con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34) (figura 4). En la figura 4, la secuencia de aminoácidos de RAGE está destacada con letras en negrita. La secuencia de inmunoglobulina son los dominios C_H2 y C_H3 de inmunoglobulina de IgG. Tal como se muestra en la figura 6B, los primeros 251 aminoácidos de la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 de longitud completa contiene como secuencia de polipéptido de RAGE una secuencia señal que comprende los aminoácidos 1-22/23, el dominio V de inmunoglobulina (incluyendo el sitio de unión a ligando) que comprende los aminoácidos 23/24-116, un ligador interdominio que comprende los aminoácidos de 117 a 123, un segundo dominio de inmunoglobulina (C1) que comprende los aminoácidos 124-221 y un ligador interdominio en el sentido C-terminal que comprende los aminoácidos 222-251.

En una realización, la proteína de fusión puede no comprender necesariamente el segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. Un constructo de ácido nucleico de ejemplo que codifica para este tipo de proteína de fusión se muestra en la figura 3 (SEQ ID NO: 31). Tal como se muestra en la figura 3, la secuencia codificante de los nucleótidos 1 a 408 (destacada en negrita) codifica para la secuencia de proteína N-terminal de RAGE, mientras que la secuencia de 409-1041 codifica para la secuencia de proteína Fc de IgG1 (γ1).

Cuando se deriva de SEQ ID NO: 31 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, la proteína de fusión puede comprender la secuencia de aminoácidos de tres dominios de SEQ ID NO: 35, o el polipéptido con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37) (figura 5). En la figura 5, la secuencia de aminoácidos de RAGE está destacada con letras en negrita. Tal como se muestra en la figura 6B, los primeros 136 aminoácidos de la proteína de fusión de RAGE TTP-3000 de longitud completa contiene como polipéptido de RAGE una secuencia señal que comprende los aminoácidos 1-22/23, el dominio V de inmunoglobulina (incluyendo el sitio de unión a ligando) que comprende los aminoácidos 23/24-116 y un ligador interdominio que comprende los aminoácidos de 117 a 136. La secuencia desde 137 hasta 346 incluye los dominios C_H2 y C_H3 de inmunoglobulina de IgG.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden comprender estabilidad *in vivo* mejorada con respecto a polipéptidos de RAGE que no comprenden un segundo polipéptido. La proteína de fusión puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad, eficacia, potencia y biodisponibilidad. Por tanto, las proteínas de fusión de la presente invención pueden modificarse mediante procesamiento postraducciona l o mediante modificación química. Por ejemplo, la proteína de fusión puede prepararse de manera sintética para incluir aminoácidos L-, D- o no naturales, aminoácidos alfa-disustituidos o N-alquilaminoácidos. Adicionalmente, pueden modificarse proteínas mediante acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión de lípidos tales como fosfatidilinositol, formación de enlaces disulfuro, y similares. Además, puede añadirse polietilenglicol para aumentar la estabilidad biológica de la proteína de fusión.

Unión de antagonistas de RAGE a proteínas de fusión de RAGE

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden comprender varias aplicaciones. Por ejemplo, la proteína de fusión de la presente invención puede usarse en un ensayo de unión para identificar ligandos de RAGE, tales como agonistas, antagonistas o moduladores de RAGE.

Por ejemplo, se da a conocer en el presente documento un método para la detección de moduladores de RAGE que comprende: (a) proporcionar una proteína de fusión que comprende un polipéptido de RAGE unido a un segundo polipéptido distinto de RAGE, en el que el polipéptido de RAGE comprende un sitio de unión a ligando; (b) mezclar un compuesto de interés y un ligando que tiene una afinidad de unión conocida para RAGE con la proteína de fusión; y (c) medir la unión del ligando de RAGE conocido a la proteína de fusión de RAGE en presencia del compuesto de interés. En una realización, el sitio de unión a ligando comprende el dominio más N-terminal de la proteína de fusión.

Las proteínas de fusión de RAGE también pueden proporcionar kits para la detección de moduladores de RAGE. Por ejemplo, en una realización, un kit puede comprender (a) un compuesto que tiene afinidad de unión conocida a RAGE como control positivo; (b) una proteína de fusión de RAGE que comprende un polipéptido de RAGE unido a

un segundo polipéptido distinto de RAGE, en el que el polipéptido de RAGE comprende un sitio de unión a ligando de RAGE; y (c) instrucciones para su uso. En una realización, el sitio de unión a ligando comprende el dominio más N-terminal de la proteína de fusión.

5 La proteína o el polipéptido de RAGE puede comprender RAGE humano de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), o un fragmento de RAGE humano. En una realización, el polipéptido de RAGE no incluye ningún residuo de secuencia señal. La secuencia señal de RAGE puede comprender o bien los residuos 1-22 o bien los residuos 1-23 de RAGE de longitud completa (SEQ ID NO: 1). En realizaciones alternativas, el polipéptido de RAGE puede comprender una secuencia idéntica en un 70%, en un 80% o en un 90% a RAGE humano, o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido de RAGE puede comprender RAGE humano, o un fragmento del mismo, con glicina como primer residuo en vez de metionina (véase por ejemplo, Neeper *et al.*, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGE de longitud completa con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3) (figuras 1A y 1B) o una porción de esa secuencia de aminoácidos. Las proteínas de fusión de la presente invención también pueden comprender RAGEs (por ejemplo, SEQ ID NO: 4), un polipéptido idéntico en un 90% a RAGEs o un fragmento de RAGEs. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender RAGEs humano, o un fragmento del mismo, con glicina como primer residuo en vez de metionina (véase por ejemplo, Neeper *et al.*, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGEs con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) (figura 1C) o una porción de esa secuencia de aminoácidos. En otras realizaciones, la proteína RAGE puede comprender un dominio V (por ejemplo, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; figura 1D). O, puede usarse una secuencia idéntica en un 90% al dominio V o un fragmento del mismo. O, la proteína RAGE puede comprender un fragmento de RAGE que comprende una porción del dominio V (por ejemplo, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, figura 1D). En una realización, el sitio de unión a ligando puede comprender SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma. Aún en otra realización, el fragmento de RAGE es un péptido sintético.

25 La proteína de fusión puede incluir varios tipos de péptidos que no se derivan de RAGE o un fragmento del mismo. El segundo polipéptido de la proteína de fusión comprende un polipéptido derivado de una inmunoglobulina. La cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los isotipos conocidos de cadena pesada: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ) o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los subtipos conocidos de cadena pesada: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. El segundo polipéptido puede comprender los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana o una porción de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como realizaciones de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana o una porción de los mismos puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40. El péptido de inmunoglobulina puede codificarse por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.

La porción Fc de la cadena de inmunoglobulina puede ser proinflamatoria *in vivo*. Por tanto, la proteína de fusión de RAGE de la presente invención puede comprender una secuencia de Fc derivada de RAGE en vez de una cadena de inmunoglobulina. La proteína de fusión comprende un dominio de inmunoglobulina de RAGE unido a un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H2 o un fragmento del mismo. El polipéptido de RAGE comprende un ligador interdominio de RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE de manera que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido N-terminal del ligador interdominio, y el aminoácido C-terminal del ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina, o un fragmento del mismo. El polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina puede comprender un polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana o una porción de ambos, o cualquiera, de estos dominios. Como realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana, o una porción de los mismos, puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

50 La proteína de fusión de la presente invención puede comprender un único dominio o múltiples dominios de RAGE. Además, el polipéptido de RAGE que comprende un ligador interdominio unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE puede comprender un fragmento de una proteína RAGE de longitud completa. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede comprender dos dominios de inmunoglobulina derivados de proteína RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. La proteína de fusión puede comprender un primer dominio de inmunoglobulina de RAGE y un primer ligador interdominio unido a un segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE y un segundo ligador interdominio de RAGE, de manera que el aminoácido N-terminal del primer ligador interdominio está unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de inmunoglobulina de RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido C-terminal del primer ligador interdominio, el aminoácido N-terminal del segundo ligador interdominio está unido al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE y el aminoácido C-terminal del segundo ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal del polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H2 o fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 19) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 20) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V, el dominio C1, el ligador interdominio que une estos dos dominios y un segundo ligador interdominio en el sentido C-terminal de C1. En una realización, un constructo de ácido nucleico que

comprende SEQ ID NO: 30 o un fragmento de la misma puede codificar para una proteína de fusión de RAGE de cuatro dominios.

Alternativamente, una proteína de fusión de tres dominios puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un único dominio de inmunoglobulina de RAGE unido por medio de un ligador interdominio de RAGE al aminoácido N-terminal del polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H2 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 15) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma o los aminoácidos 24-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 16) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma correspondiente al dominio V de RAGE y un ligador interdominio en el sentido C-terminal. En una realización, un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 31 o un fragmento de la misma puede codificar para una proteína de fusión de RAGE de tres dominios.

Tal como se describe en el presente documento, un fragmento de ligador interdominio de RAGE puede comprender una secuencia de péptido que se encuentra de manera natural en el sentido C-terminal de, y por tanto, unida a, un dominio de inmunoglobulina de RAGE. Por ejemplo, para el dominio V de RAGE, el ligador interdominio puede comprender secuencias de aminoácidos que se encuentran de manera natural en el sentido C-terminal del dominio V. En una realización, el ligador puede comprender SEQ ID NO: 21, correspondiente a los aminoácidos 117-123 de RAGE de longitud completa. O, el ligador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia de RAGE natural. Por ejemplo, puede usarse un ligador interdominio que comprende varios aminoácidos (por ejemplo, 1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos) en el sentido N-terminal y en el sentido C-terminal de SEQ ID NO: 21. Por tanto, en una realización, el ligador interdominio comprende SEQ ID NO: 23 que comprende los aminoácidos 117-136 de RAGE de longitud completa. O, pueden usarse fragmentos de SEQ ID NO: 21 delecionando, por ejemplo, 1, 2 ó 3 aminoácidos de cualquier extremo del ligador. En realizaciones alternativas, el ligador puede comprender una secuencia que es idéntica en un 70% o idéntica en un 80% o idéntica en un 90% a SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 23.

Para el dominio C1 de RAGE, el ligador puede comprender una secuencia de péptido que se encuentra de manera natural en el sentido C-terminal del dominio C1. En una realización, el ligador puede comprender SEQ ID NO: 22, correspondiente a los aminoácidos 222-251 de RAGE de longitud completa. O, el ligador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia de RAGE natural. Por ejemplo, puede usarse un ligador que comprende varios (1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos) aminoácidos en el sentido N-terminal y en el sentido C-terminal de SEQ ID NO: 22. O, pueden usarse fragmentos de SEQ ID NO: 22, delecionando por ejemplo, 1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos de cualquier extremo del ligador. Por ejemplo, en una realización, un ligador interdominio de RAGE puede comprender SEQ ID NO: 24, correspondiente a los aminoácidos 222-226. O un ligador interdominio puede comprender SEQ ID NO: 44, correspondiente a los aminoácidos 318-342 de RAGE.

Por ejemplo, la proteína de fusión de RAGE puede usarse en un ensayo de unión para identificar posibles ligandos de RAGE. En una realización de ejemplo de un ensayo de unión de este tipo, puede recubrirse un ligando de RAGE conocido sobre un sustrato sólido (por ejemplo, placas Maxisorb) a una concentración de aproximadamente 5 microgramos por pocillo, en el que cada pocillo contiene un volumen total de aproximadamente 100 microlitros (µl). Pueden incubarse las placas a 4°C durante la noche para permitir que se absorba el ligando. Alternativamente, pueden usarse periodos de incubación más cortos a temperatura superior (por ejemplo, temperatura ambiente). Tras un periodo de tiempo para permitir que el ligando se una al sustrato, pueden aspirarse los pocillos de ensayo y puede añadirse un tampón de bloqueo (por ejemplo, BSA al 1% en tampón de imidizol 50 mM, pH 7,2) para bloquear la unión no específica. Por ejemplo, puede añadirse tampón de bloqueo a las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces pueden aspirarse las placas y/o lavarse con un tampón de lavado. En una realización, puede usarse un tampón que comprende imidizol 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05%, CaCl₂ 5 mM y MgCl₂ 5 mM, pH 7,2 como tampón de lavado. Entonces puede añadirse la proteína de fusión a diluciones crecientes a los pocillos de ensayo. Entonces puede permitirse que se incube la proteína de fusión de RAGE con el ligando inmovilizado en el pocillo de ensayo de manera que la unión pueda alcanzar el equilibrio. En una realización, se permite que se incube la proteína de fusión de RAGE con el ligando inmovilizado durante aproximadamente una hora a 37°C. En realizaciones alternativas, pueden usarse periodos de incubación más largos a temperaturas inferiores. Tras haberse incubado la proteína de fusión y el ligando inmovilizado, puede lavarse la placa para eliminar cualquier proteína de fusión no unida. Puede detectarse la proteína de fusión unida al ligando inmovilizado de varios modos. En una realización, la detección emplea un ELISA. Por tanto, en una realización, puede añadirse un complejo de inmunodetección que contiene un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG1 humana, anticuerpo de cabra biotinilado anti-IgG de ratón y una fosfatasa alcalina unida a avidina a la proteína de fusión inmovilizada en el pocillo de ensayo. Puede permitirse que el complejo de inmunodetección se una a la proteína de fusión inmovilizada de manera que la unión entre la proteína de fusión y el complejo de inmunodetección alcance el equilibrio. Por ejemplo, puede permitirse que el complejo se una a la proteína de fusión durante una hora a temperatura ambiente. En ese momento, puede eliminarse cualquier complejo no unido lavando el pocillo de ensayo con tampón de lavado. Puede detectarse el complejo unido añadiendo el sustrato de fosfatasa alcalina, fosfato de para-nitrofenilo (PNPP) y midiendo la conversión de PNPP en para-nitrofenol (PNP) como un aumento de la absorbancia a 405 nm.

En una realización, el ligando de RAGE se une a la proteína de fusión de RAGE con afinidad nanomolar (nM) o micromolar (μ M). Un experimento que ilustra la unión de ligandos de RAGE a proteínas de fusión de RAGE de la presente invención se muestra en la figura 7. Se prepararon disoluciones de TTP-3000 (TT3) y TTP-4000 (TT4) que tenían concentraciones iniciales de 1,082 mg/ml y 370 μ g/ml, respectivamente. Tal como se muestra en la figura 7, a

diversas diluciones, la proteínas de fusión TTP-3000 y TTP-4000 pueden unirse a los ligandos de RAGE inmovilizados amiloide-beta (Abeta) (amiloide beta (1-40) de Biosource), S100b (S100) y anfoterina (Ampho), dando como resultado un aumento de la absorbancia. En ausencia de ligando (es decir, recubrimiento con BSA sólo) no hubo aumento de la absorbancia.

El ensayo de unión de la presente invención puede usarse para cuantificar la unión del ligando a RAGE. En realizaciones alternativas, los ligandos de RAGE pueden unirse a la proteína de fusión de la presente invención con afinidades de unión que oscilan entre 0,1 y 1000 nanomolar (nM) o entre 1 y 500 nM o entre 10 y 80 nM.

La proteína de fusión de la presente invención también puede usarse para identificar compuestos que tienen la capacidad de unirse a RAGE. Tal como se muestra en las figuras 8 y 9, respectivamente, puede someterse a ensayo un ligando de RAGE para determinar su capacidad para competir con amiloide beta inmovilizado por la unión a las proteínas de fusión TTP-4000 (TT4) o TTP-3000 (TT3). Por tanto, puede observarse que un ligando de RAGE a una concentración de ensayo final (FAC) de 10 μ M puede desplazar la unión de la proteína de fusión de RAGE a amiloide beta a concentraciones de 1:3, 1:10, 1:30 y 1:100 de la disolución inicial de TTP-4000 (figura 8) o TTP-3000 (figura 9).

Modulación de efectores celulares

Pueden usarse realizaciones de las proteínas de fusión de la presente invención para modular una respuesta biológica mediada por RAGE. Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden diseñarse para modular aumentos de la expresión génica inducidos por RAGE. Por tanto, en una realización, pueden usarse proteínas de fusión de la presente invención para modular la función de enzimas biológicas. Por ejemplo, la interacción entre RAGE y sus ligandos puede generar estrés oxidativo y activación de NF- κ B y genes regulados por NF- κ B, tales como las citocinas IL-1 β , TNF- α y similares. Además, se ha mostrado que varias otras rutas reguladoras, tales como las que implican p21ras, MAP cinasas, ERK1 y ERK2, se activan mediante la unión de AGE y otros ligandos a RAGE.

En la figura 10 se muestra el uso de las proteínas de fusión de la presente invención para modular la expresión del efector celular TNF- α . Pueden cultivarse células mieloides THP-1 en medios RPMI-1640 complementados con FBS al 10% e inducirse para que secreten TNF- α mediante estimulación de RAGE con S100b. Cuando se produce tal estimulación en presencia de una proteína de fusión de RAGE, puede inhibirse la inducción de TNF- α mediante la unión de S100b a RAGE. Por tanto, tal como se muestra en la figura 10, la adición de 10 μ g de proteína de fusión de RAGE TTP-3000 (TT3) o TTP-4000 (TT4) reduce la inducción mediante S100b de TNF- α en de aproximadamente el 50% al 75%. La proteína de fusión TTP-4000 puede ser al menos tan eficaz en el bloqueo de la inducción mediante S100b de TNF- α como RAGE (figura 10). La especificidad de la inhibición para las secuencias de RAGE de TTP-4000 y TTP-3000 se muestra mediante el experimento en el que se añadió IgG sola a células estimuladas con S100b. La adición de IgG y S100b al ensayo muestra los mismos niveles de TNF- α que S100b solo.

Características fisiológicas de proteínas de fusión de RAGE

Aunque RAGEs puede tener un beneficio terapéutico en la modulación de enfermedades mediadas por RAGE, RAGEs humano puede tener limitaciones como agente terapéutico independientemente basándose en la semivida relativamente corta de RAGEs en plasma. Por ejemplo, mientras que RAGEs de roedor tiene una semivida en ratas normales y diabéticas de aproximadamente 20 horas, RAGEs humano tiene una semivida inferior a 2 horas cuando se somete a ensayo mediante retención de inmunorreactividad de RAGEs (Renard *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 290:1458-1466 (1999)).

Para generar un agente terapéutico de RAGE que tenga características de unión similares a las de RAGEs, pero un perfil farmacocinético más estable, puede usarse una proteína de fusión de RAGE que comprende un sitio de unión a ligando de RAGE unido a uno o más dominios de inmunoglobulina humana. Tal como se conoce en la técnica, los dominios de inmunoglobulina pueden incluir la porción Fc de la cadena pesada de inmunoglobulina.

La porción Fc de inmunoglobulina puede conferir varios atributos a una proteína de fusión. Por ejemplo, la proteína de fusión de Fc puede aumentar la semivida en suero de tales proteínas de fusión, con frecuencia desde horas hasta varios días. El aumento de la estabilidad farmacocinética es generalmente un resultado de la interacción del ligador entre las regiones C_H2 y C_H3 del fragmento Fc con el receptor FcRn (Wines *et al.*, J. Immunol., 164:5313-5318 (2000)).

Aunque proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de Fc de inmunoglobulina pueden proporcionar la ventaja de estabilidad aumentada, las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden provocar una respuesta inflamatoria cuando se introducen en un huésped. La respuesta inflamatoria puede deberse, en gran parte, a la

porción Fc de la inmunoglobulina de la proteína de fusión. La respuesta proinflamatoria puede ser una característica deseable si la diana se expresa en un tipo de célula enferma que se necesita eliminar (por ejemplo, una célula cancerosa, un linfocito o una población de linfocitos que provocan una enfermedad autoinmunitaria). La respuesta proinflamatoria puede ser una característica neutra si la diana es una proteína soluble, ya que la mayoría de las proteínas solubles no activan inmunoglobulinas. Sin embargo, la respuesta proinflamatoria puede ser una característica negativa si la diana se expresa en tipos de células cuya destrucción conducirá a efectos secundarios desfavorables. Además, la respuesta proinflamatoria puede ser una característica negativa si se establece una cascada inflamatoria en el sitio de una unión de la proteína de fusión a una diana tisular, puesto que muchos mediadores de la inflamación pueden ser perjudiciales para el tejido circundante y/o pueden provocar efectos sistémicos.

El sitio proinflamatorio principal en fragmentos Fc de inmunoglobulina reside en la región bisagra entre C_{H1} y C_{H2}. Esta región bisagra interacciona con FcR1-3 en diversos leucocitos y provoca que estas células ataquen la diana. (Wines *et al.*, J. Immunol., 164:5313-5318 (2000)).

Como agentes terapéuticos para enfermedades mediadas por RAGE, las proteínas de fusión de RAGE pueden no requerir la generación de una respuesta inflamatoria. Por tanto, realizaciones de las proteínas de fusión de RAGE de la presente invención pueden comprender una proteína de fusión que comprende un polipéptido de RAGE unido a un(os) dominio(s) de inmunoglobulina(s) en donde se elimina la región bisagra Fc de la inmunoglobulina y se sustituye por un polipéptido de RAGE. De este modo, puede minimizarse la interacción entre la proteína de fusión de RAGE y receptores de Fc en células inflamatorias. Sin embargo, puede ser importante mantener un apilamiento apropiado y otras interacciones de estructura tridimensional entre los diversos dominios de inmunoglobulina de la proteína de fusión. Por tanto, realizaciones de las proteínas de fusión de la presente invención pueden sustituir el ligador interdominio de RAGE biológicamente inerte, pero estructuralmente similar que separa los dominios V y C1 de RAGE, o el ligador que separa los dominios C1 y C2 de RAGE, en lugar de la región bisagra normal de la cadena pesada de inmunoglobulina. Por tanto, el polipéptido de RAGE de la proteína de fusión puede comprender una secuencia de ligador interdominio que se encuentra de manera natural en el sentido C-terminal de un dominio de inmunoglobulina de RAGE para formar un fragmento de ligador/dominio de inmunoglobulina de RAGE. De este modo, pueden mantenerse las interacciones tridimensionales entre los dominios de inmunoglobulina a las que contribuyen o bien RAGE o bien la inmunoglobulina.

En una realización, una proteína de fusión de RAGE de la presente invención puede comprender un aumento sustancial de la estabilidad farmacocinética en comparación con RAGEs. Por ejemplo, la figura 11 muestra que una vez que la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 ha saturado sus ligandos, puede conservar una semivida de más de 300 horas. Esto puede contrastarse con la semivida para RAGEs de tan sólo unas pocas horas en plasma humano.

Por tanto, en una realización, las proteínas de fusión de RAGE de la presente invención pueden usarse para antagonizar la unión de ligandos fisiológicos a RAGE como medio para tratar enfermedades mediadas por RAGE sin generar una cantidad inaceptable de inflamación. Las proteínas de fusión de la presente invención pueden presentar una disminución sustancial en la generación de una respuesta proinflamatoria en comparación con IgG. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 12, la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 no estimula la liberación de TNF- α a partir de células en condiciones en las que se detecta estimulación por IgG humana de la liberación de TNF- α .

Tratamiento de enfermedad con proteínas de fusión de RAGE

En el presente documento se dan a conocer métodos para el tratamiento de un trastorno mediado por RAGE en un sujeto humano. En una realización, el método puede comprender administrar a un sujeto una proteína de fusión que comprende un polipéptido de RAGE que comprende un sitio de unión a ligando de RAGE unido a un segundo polipéptido distinto de RAGE. La proteína de fusión comprende un sitio de unión a ligando de RAGE. En una realización, el sitio de unión a ligando comprende el dominio más N-terminal de la proteína de fusión. El sitio de unión a ligando de RAGE puede comprender el dominio V de RAGE o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión a ligando de RAGE comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma.

El polipéptido de RAGE puede estar unido a un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción (por ejemplo, un fragmento del mismo) de un dominio de inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina comprende al menos una porción de al menos uno de los dominios C_{H2} o C_{H3} de una IgG humana.

La proteína o el polipéptido de RAGE puede comprender RAGE humano de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) o un fragmento de RAGE humano. En una realización, el polipéptido de RAGE no incluye ningún residuo de secuencia señal. La secuencia señal de RAGE puede comprender o bien los residuos 1-22 o bien los residuos 1-23 de RAGE de longitud completa (SEQ ID NO: 1). En realizaciones alternativas, el polipéptido de RAGE puede comprender una secuencia que es idéntica en un 70%, en un 80% o en un 90% a RAGE humano o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido de RAGE puede comprender RAGE humano o un fragmento

del mismo, con glicina como primer residuo en vez de metionina (véase por ejemplo, Neeper *et al.*, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGE de longitud completa con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3) (figuras 1A y 1B) o una porción de esa secuencia de aminoácidos. Las proteínas de fusión de la presente invención también pueden comprender RAGEs (por ejemplo, SEQ ID NO: 4), un polipéptido idéntico en un 90% a RAGEs o un fragmento de RAGEs. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender RAGEs humano o un fragmento del mismo, con glicina como primer residuo en vez de metionina (véase por ejemplo, Neeper *et al.*, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGEs con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) (figura 1C) o una porción de esa secuencia de aminoácidos. En otras realizaciones, la proteína RAGE puede comprender un dominio V (por ejemplo, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; figura 1D). O, puede usarse una secuencia idéntica en un 90% al dominio V o un fragmento del mismo. O, la proteína RAGE puede comprender un fragmento de RAGE que comprende una porción del dominio V (por ejemplo, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, figura 1D). En una realización, el sitio de unión a ligando puede comprender SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma. Aún en otra realización, el fragmento de RAGE es un péptido sintético.

La proteína de fusión puede incluir varios tipos de péptidos que no se derivan de RAGE o un fragmento del mismo. El segundo polipéptido de la proteína de fusión comprende un polipéptido derivado de una inmunoglobulina. La cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los isotipos conocidos de cadena pesada: IgG (γ), IgM (μ), IgD (ϵ), IgE (ϵ) o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los subtipos conocidos de cadena pesada: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. El segundo polipéptido puede comprender los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana o una porción de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como realizaciones de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana o una porción de los mismos puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40. El péptido de inmunoglobulina puede codificarse por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.

Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-116 de RAGE humano (SEQ ID NO: 7) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-116 de RAGE humano (SEQ ID NO: 8) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V de RAGE. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 124-221 de RAGE humano (SEQ ID NO: 11) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio C1 de RAGE. En otra realización, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 227-317 de RAGE humano (SEQ ID NO: 12) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio C2 de RAGE. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-123 de RAGE humano (SEQ ID NO: 13) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-123 de RAGE humano (SEQ ID NO: 14) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V de RAGE y un ligador interdominio en el sentido C-terminal. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-226 de RAGE humano (SEQ ID NO: 17) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-226 de RAGE humano (SEQ ID NO: 18) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V, el dominio C1 y el ligador interdominio que une estos dos dominios. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 5) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o 24-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 6) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente a RAGEs (es decir, que codifica para los dominios V, C1 y C2 y ligadores interdominio). O, pueden usarse fragmentos de cada una de estas secuencias.

La porción Fc de la cadena de inmunoglobulina puede ser proinflamatoria *in vivo*. Por tanto, la proteína de fusión de RAGE de la presente invención comprende un ligador interdominio derivado de RAGE en vez de un polipéptido bisagra interdominio derivado de una inmunoglobulina.

Por tanto en una realización, la proteína de fusión puede comprender además un polipéptido de RAGE unido directamente a un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina o un fragmento del mismo. En una realización, el dominio C_H2 o un fragmento del mismo comprende SEQ ID NO: 42.

El polipéptido de RAGE comprende un ligador interdominio de RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE de tal manera que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido N-terminal del ligador interdominio, y el aminoácido C-terminal del ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina o un fragmento del mismo. El polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina puede comprender los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana. Como realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

La proteína de fusión de la presente invención puede comprender un único dominio o múltiples dominios de RAGE. Además, el polipéptido de RAGE que comprende un ligador interdominio unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE puede comprender un fragmento de una proteína RAGE de longitud completa. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede comprender dos dominios de inmunoglobulina derivados de proteína RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. La proteína de fusión puede comprender un primer dominio de inmunoglobulina de RAGE y un primer ligador interdominio unido a un segundo

dominio de inmunoglobulina de RAGE y un segundo ligador interdominio de RAGE, de tal manera que el aminoácido N-terminal del primer ligador interdominio está unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de inmunoglobulina de RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido C-terminal del primer ligador interdominio, el aminoácido N-terminal del segundo ligador interdominio está unido al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE y el aminoácido C-terminal del segundo ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal del polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H2 o fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 19) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 20) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V, el dominio C1, el ligador interdominio que une estos dos dominios y un segundo ligador interdominio en el sentido C-terminal de C1. En una realización, un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 30 o un fragmento de la misma puede codificar para una proteína de fusión de RAGE de cuatro dominios.

Alternativamente, una proteína de fusión de tres dominios puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un único dominio de inmunoglobulina de RAGE unido mediante un ligador interdominio de RAGE al aminoácido N-terminal del polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H2 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 15) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma o los aminoácidos 24-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 16) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma correspondiente al dominio V de RAGE y un ligador interdominio en el sentido C-terminal. En una realización, un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 31 o un fragmento de la misma puede codificar para una proteína de fusión de RAGE de tres dominios.

Un fragmento de ligador interdominio de RAGE puede comprender una secuencia de péptido que se encuentra de manera natural en el sentido C-terminal de, y por tanto, unida a, un dominio de inmunoglobulina de RAGE. Por ejemplo, para el dominio V de RAGE, el ligador interdominio puede comprender secuencias de aminoácidos que se encuentran de manera natural en el sentido C-terminal del dominio V. En una realización, el ligador puede comprender SEQ ID NO: 21, correspondiente a los aminoácidos 117-123 de RAGE de longitud completa. O, el ligador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia de RAGE natural. Por ejemplo, puede usarse un ligador interdominio que comprende varios aminoácidos (por ejemplo, 1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos) en el sentido N-terminal y en el sentido C-terminal de SEQ ID NO: 21. Por tanto, en una realización, el ligador interdominio comprende SEQ ID NO: 23 que comprende los aminoácidos 117-136 de RAGE de longitud completa. O, pueden usarse fragmentos de SEQ ID NO: 21 delecionando, por ejemplo, 1, 2 ó 3 aminoácidos de cualquier extremo del ligador. En realizaciones alternativas, el ligador puede comprender una secuencia que es idéntica en un 70% o idéntica en un 80% o idéntica en un 90% a SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 23.

Para el dominio C1 de RAGE, el ligador puede comprender una secuencia de péptido que se encuentra de manera natural en el sentido C-terminal del dominio C1. En una realización, el ligador puede comprender SEQ ID NO: 22, correspondiente a los aminoácidos 222-251 de RAGE de longitud completa. O, el ligador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia de RAGE natural. Por ejemplo, puede usarse un ligador que comprende varios aminoácidos (1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos) en el sentido N-terminal y en el sentido C-terminal de SEQ ID NO: 22. O, pueden usarse fragmentos de SEQ ID NO: 22, delecionando por ejemplo, 1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos de cualquier extremo del ligador. Por ejemplo, en una realización, un ligador interdominio de RAGE puede comprender SEQ ID NO: 24, correspondiente a los aminoácidos 222-226. O un ligador interdominio puede comprender SEQ ID NO: 44, correspondiente a los aminoácidos 318-342 de RAGE.

En una realización, puede administrarse una proteína de fusión de la presente invención por diversas vías. La administración de la proteína de fusión de RAGE de la presente invención puede emplear inyección intraperitoneal (i.p.). Alternativamente, la proteína de fusión de RAGE puede administrarse por vía oral, por vía intranasal o como aerosol. En otra realización, administración es intravenosa (i.v.). La proteína de fusión de RAGE también puede inyectarse por vía subcutánea. En otra realización, la administración de la proteína de fusión es intraarterial. En otra realización, la administración es sublingual. Además, la administración puede emplear una cápsula de liberación con el tiempo. Aún en otra realización, la administración puede ser transrectal, tal como mediante un supositorio o similar. Por ejemplo, la administración subcutánea puede ser útil para tratar trastornos crónicos cuando es deseable la administración por el propio paciente.

Se ha usado una variedad de modelos animales para validar el uso de compuestos que modulan RAGE como agentes terapéuticos. Ejemplos de estos modelos son los siguientes:

a) RAGEs inhibió la formación de neointima en un modelo de rata de reestenosis tras lesión arterial en ratas tanto diabéticas como normales inhibiendo la activación endotelial, de músculo liso y de macrófagos por medio de RAGE (Zhou *et al.*, Circulation 107:2238-2243 (2003));

b) la inhibición de interacciones RAGE/ligando, usando o bien RAGEs o bien un anticuerpo anti-RAGE, redujo la

formación de placas amiloides en un modelo de ratón de amiloidosis sistémica (Yan *et al.*, Nat. Med., 6:643-651 (2000)). Junto a la reducción de placas amiloides hubo una reducción de las citocinas inflamatorias, interleucina-6 (IL-6) y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) así como una activación reducida de NF- κ B en los animales tratados;

c) ratones transgénicos para RAGE (ratones que sobreexpresan RAGE y ratones que expresan de manera dominante negativa RAGE) muestran formación de placas y déficits cognitivos en un modelo de ratón de EA (Arancio *et al.*, EMBO J., 23:4096-4105 (2004));

d) El tratamiento de ratas diabéticas con RAGEs redujo la permeabilidad vascular (Bonnardel-Phu *et al.*, Diabetes, 48: 2052-2058 (1999));

e) El tratamiento con RAGEs redujo las lesiones ateroscleróticas en ratones nulos para apolipoproteína E diabéticos y previno los indicios funcionales y morfológicos de nefropatía diabética en ratones db/db (Hudson *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 419:80-88 (2003)); y

f) RAGEs atenuó la intensidad de la inflamación en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (Hofmann *et al.*, Genes Immunol., 3:123-135 (2002)), un modelo de ratón de encefalomiелitis alérgica experimental (Yan *et al.*, Nat. Med. 9:28-293 (2003)) y un modelo de ratón de enfermedad inflamatoria del intestino (Hofmann *et al.*, Cell, 97:889-901 (1999)).

Por tanto, en una realización, las proteínas de fusión de la presente invención pueden usarse para tratar un síntoma de diabetes y/o complicaciones resultantes de la diabetes mediados por RAGE. En realizaciones alternativas, el síntoma de diabetes o complicaciones diabéticas tardías pueden comprender nefropatía diabética, retinopatía diabética, una úlcera de pie diabético, una complicación cardiovascular de diabetes o neuropatía diabética.

Originalmente identificado como receptor para moléculas cuya expresión está asociada con la patología de la diabetes, el propio RAGE es esencial para la fisiopatología de las complicaciones diabéticas. *In vivo*, se ha mostrado que la inhibición de la interacción de RAGE con su(s) ligando(s) es terapéutica en múltiples modelos de complicaciones diabéticas e inflamación (Hudson *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 419:80-88 (2003)). Por ejemplo, un tratamiento de dos meses con anticuerpos anti-RAGE normalizó la función renal y redujo la histopatología renal anómala en ratones diabéticos (Flyvbjerg *et al.*, Diabetes 53: 166-172 (2004)). Además, el tratamiento con una forma soluble de RAGE (RAGEs) que se une a ligandos de RAGE e inhibe interacciones RAGE/ligando, redujo las lesiones ateroscleróticas en ratones nulos para apolipoproteína E diabéticos y atenuó la patología funcional y morfológica de nefropatía diabética en ratones db/db (Bucciarelli *et al.*, Circulation 106: 2827-2835 (2002)).

Además, se ha mostrado que la glicosilación no enzimática de macromoléculas que da como resultado en última instancia la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGE) se potencia en sitios de inflamación, en insuficiencia renal, en presencia de hiperglucemia y otros estados asociados con estrés oxidativo sistémico o local (Dyer *et al.*, J. Clin. Invest., 91: 2463-2469 (1993); Reddy *et al.*, Biochem., 34:10872-10878 (1995); Dyer *et al.*, J. Biol. Chem., 266:11654-11660 (1991); Degenhardt *et al.*, Cell Mol. Biol., 44:1139-1145 (1998)). La acumulación de AGE en la vasculatura puede producirse de manera centrada, como en el amiloide articular compuesto por AGE- β_2 -microglobulina encontrado en pacientes con amiloidosis relacionada con diálisis (Miyata *et al.*, J. Clin. Invest., 92:1243-1252 (1993); Miyata *et al.*, J. Clin. Invest., 98:1088-1094 (1996)), o de manera general, tal como se muestra a modo de ejemplo mediante la vasculatura y los tejidos de pacientes con diabetes (Schmidt *et al.*, Nature Med., 1:1002-1004 (1995)). La acumulación progresiva de AGE a lo largo del tiempo en pacientes con diabetes sugiere que los mecanismos de aclaramiento endógenos no pueden funcionar eficazmente en sitios de deposición de AGE. Tales AGE acumulados tienen la capacidad de alterar las propiedades celulares mediante varios mecanismos. Aunque RAGE se expresa a niveles bajos en tejidos y vasculatura normales, en un entorno en el que se acumulan los ligandos del receptor, se ha mostrado que RAGE se regula por incremento (Li *et al.*, J. Biol. Chem., 272:16498-16506 (1997); Li *et al.*, J. Biol. Chem., 273:30870-30878 (1998); Tanaka *et al.*, J. Biol. Chem., 275:25781-25790 (2000)). La expresión RAGE aumenta en el endotelio, células de músculo liso y fagocitos mononucleares infiltrantes en la vasculatura diabética. Además, estudios en cultivo celular han demostrado que la interacción AGE-RAGE provoca cambios en propiedades celulares importantes en la homeostasis vascular.

En la figura 13 se ilustra el uso de las proteínas de fusión de RAGE en el tratamiento de la patología relacionada con la diabetes. Se evaluó la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 en un modelo de rata diabética de reestenosis que implicó medir la proliferación de músculo liso y la expansión de la íntima tras lesión vascular. Tal como se ilustra en la figura 13, el tratamiento con TTP-4000 puede reducir significativamente la razón íntima/media (I/M) (figura 13A; tabla 1) en la reestenosis asociada con diabetes de una manera sensible a la dosis. Además, el tratamiento con TTP-4000 puede reducir significativamente la proliferación de células del músculo liso vascular asociada con reestenosis de una manera sensible a la dosis.

Tabla 1

Efecto de TTP-4000 en modelo de rata de reestenosis			
	IgG (n=9)	TTP-4000 (n=9), dosis baja** (0,3 mg/animal qod x 4)	TTP-4000 (n=9), dosis alta** (1,0 mg/animal qod x 4)
Área de la luz (mm ²)	0,2 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,16 ± 0,02
Área de la media (mm ²)	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,01
Razón I/M	1,71 ± 0,27	1,61 ± 0,26	1,44* ± 0,15

*P<0,05

** Tanto para la dosis alta como para la baja, se usó una dosis de carga de 3 mg/animal.

- En otras realizaciones, las proteínas de fusión de la presente invención también pueden usarse para tratar o revertir
- 5 amiloidosis y enfermedad de Alzheimer. RAGE es un receptor para amiloide beta (Aβ) así como otras proteínas amiloidogénicas incluyendo SAA y amilina (Yan *et al.*, Nature, 382:685-691 (1996); Yan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94:5296-5301 (1997); Yan *et al.*, Nat. Med., 6:643-651 (2000); Sousa *et al.*, Lab Invest., 80:1101-1110 (2000)). Además, los ligandos de RAGE, incluyendo los AGE, S100b y proteínas Aβ, se encuentran en tejido circundante a la
- 10 placa senil en el ser humano (Luth *et al.*, Cereb. Cortex 15:211-220 (2005); Petzold *et al.*, Neurosci. Lett., 336:167-170 (2003); Sasaki *et al.*, Brain Res., 12:256-262 (2001); Yan *et al.*, Restor. Neurol. Neurosci., 12:167-173 (1998)). Se ha mostrado que RAGE se une a material fibrilar de lámina β independientemente de la composición de las subunidades (péptido amiloide-β, amilina, amiloide A sérico, péptido derivado de priones) (Yan *et al.*, Nature, 382:685-691 (1996); Yan *et al.*, Nat. Med., 6:643-651 (2000)). Además, se ha mostrado que la deposición de amiloide da como resultado una expresión potenciada de RAGE. Por ejemplo, en los cerebros de pacientes con
- 15 enfermedad de Alzheimer (EA), la expresión de RAGE aumenta en neuronas y en la glía (Yan, *et al.*, Nature 382:685-691 (1996)). De manera concurrente con la expresión de ligandos de RAGE, RAGE se regula por incremento en astrocitos y células de la microglía en el hipocampo de individuos con EA pero no se regula por incremento en individuos que no tienen EA (Lue *et al.*, Exp. Neurol., 171:29-45 (2001)). Estos hallazgos sugieren que las células que expresan RAGE se activan mediante interacciones RAGE/ligando de RAGE en la proximidad de
- 20 la placa senil. Además, *in vitro*, la activación mediada por Aβ de células de la microglía puede bloquearse con anticuerpos dirigidos contra el dominio de unión a ligando de RAGE (Yan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94:5296-5301 (1997)). También se ha demostrado que RAGE puede servir como punto central para el ensamblaje de fibrillas (Deane *et al.*, Nat. Med. 9:907-913 (2003)).
- 25 Además, la inhibición *in vivo* de interacciones RAGE/ligando usando o bien RAGEs o bien un anticuerpo anti-RAGE puede reducir la formación de placas amiloides en un modelo de ratón de amiloidosis sistémica (Yan *et al.*, Nat. Med., 6:643-651 (2000)). Ratones dobles transgénicos que sobreexpresan RAGE humano y proteína precursora de amiloide (APP) humana con las mutaciones Swedish y London (mutante hAPP) en neuronas desarrollan defectos del aprendizaje y anomalías neuropatológicas antes que sus equivalentes transgénicos para hAPP mutantes
- 30 individuales. En cambio, los ratones dobles transgénicos con disminución de la capacidad de señalización de Aβ debido a neuronas que expresan una forma negativa dominante de RAGE en el mismo trasfondo de hAPP mutante muestran una aparición retardada de anomalías neuropatológicas y del aprendizaje en comparación con su equivalente transgénico para APP individual (Arancio *et al.*, EMBO J., 23:4096-4105 (2004)).
- 35 Además, se ha mostrado que la inhibición de la interacción RAGE-amiloide disminuye la expresión de RAGE celular y marcadores de estrés celular (así como la activación de NF-κB) y disminuye la deposición de amiloide (Yan *et al.*, Nat. Med. 6:643-651 (2000)) lo que sugiere un papel para la interacción RAGE-amiloide tanto en la perturbación de las propiedades celulares en un entorno enriquecido para amiloide (incluso en fases tempranas) como en la acumulación de amiloide.
- 40 Por tanto, las proteínas de fusión de RAGE de la presente invención también pueden usarse para tratar, reducir la amiloidosis y para reducir las placas amiloides y la disfunción cognitiva asociada con enfermedad de Alzheimer (EA). Tal como se describió anteriormente, se ha mostrado que RAGEs reduce tanto la formación de placas amiloides en el cerebro como el posterior aumento de marcadores inflamatorios en un modelo animal de EA. Las figuras 14A y
- 45 14B muestran que ratones que tienen EA, y se tratan durante 3 meses o bien con TTP-4000 o bien con RAGEs de ratón, tenían menos placas de amiloide beta (Aβ) y menos disfunción cognitiva que animales que recibieron un vehículo o un control negativo de IgG humana (IgG1). Al igual que RAGEs, TTP-4000 también puede reducir las citocinas inflamatorias IL-1 y TNF-α (datos no mostrados) asociadas con EA.
- 50 Además, pueden usarse proteínas de fusión de la presente invención para tratar la aterosclerosis y otros trastornos cardiovasculares. Por tanto, se ha mostrado que la cardiopatía isquémica es particularmente alta en pacientes con diabetes (Robertson, *et al.*, Lab Invest., 18:538-551 (1968); Kannel *et al.*, J. Am. Med. Assoc., 241:2035-2038 (1979); Kannel *et al.*, Diab. Care, 2:120-126 (1979)). Además, estudios han mostrado que la aterosclerosis en pacientes con

diabetes está más acelerada y es más extensa que en pacientes que no padecen diabetes (véase por ejemplo Waller *et al.*, Am. J. Med., 69:498-506 (1980); Crall *et al.*, Am. J. Med. 64:221-230 (1978); Hamby *et al.*, Chest, 2:251-257 (1976); y Pyorala *et al.*, Diab. Metab. Rev., 3: 463-524 (1978)). Aunque los motivos para la aterosclerosis acelerada en el entorno de diabetes son muchos, se ha mostrado que la reducción de AGE puede reducir la formación de placas.

Por ejemplo, las proteínas de fusión de RAGE de la presente invención también pueden usarse para tratar el accidente cerebrovascular. Cuando se comparó TTP-4000 con RAGEs en un modelo de animal relevante para la enfermedad de accidente cerebrovascular, se encontró que TTP-4000 proporcionaba una reducción significativamente mayor del volumen de infarto. En este modelo, se liga la arteria carótida media de un ratón y después se somete a reperusión para formar un infarto. Para evaluar la eficacia de proteínas de fusión de RAGE para tratar o prevenir el accidente cerebrovascular, se trataron ratones con RAGEs o TTP-4000 o inmunoglobulina de control justo antes de la reperusión. Tal como puede observarse en la tabla 2, TTP-4000 fue más eficaz que RAGEs en limitar el área de infarto en estos animales lo que sugiere que TTP-4000, debido a su mejor semivida en plasma, podía mantener una protección mayor que RAGEs.

Tabla 2

Reducción de infarto en accidente cerebrovascular	
	% de reducción de infarto**
RAGEs	15%*
TTP-4000 (300 µg)	38%*
TTP-4000 (300 µg)	21%*
TTP-4000 (300 µg)	10%*
Control de isotipo de IgG (300 µg)	4%

*Significativo para $p < 0.001$; **En comparación con solución salina

En otra realización, las proteínas de fusión de la presente invención pueden usarse para tratar el cáncer. En una realización, el cáncer tratado usando las proteínas de fusión de la presente invención comprende células cancerosas que expresan RAGE. Por ejemplo, los cánceres que pueden tratarse con la proteína de fusión de RAGE de la presente invención incluyen algunos cánceres de pulmón, algunos gliomas, algunos papilomas y similares. La anfoterina es una proteína de unión a ADN cromosómico distinta de histona del grupo I de alta movilidad (Rauvala *et al.*, J. Biol. Chem., 262: 16625-16635 (1987); Parkikinen *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 19726-19738 (1993)) que se ha mostrado que interacciona con RAGE. Se ha mostrado que la anfoterina promueve el crecimiento de neuritas, así como sirve como superficie para el ensamblaje de complejos de proteasa en el sistema fibrinolítico (que también se sabe que contribuye a la movilidad celular). Además, se ha observado un efecto inhibidor del crecimiento tumoral local de bloquear RAGE en un modelo de tumor primario (glioma C6), el modelo de metástasis pulmonar de Lewis (Taguchi *et al.*, Nature 405:354-360 (2000)) y papilomas que surgen de manera espontánea en ratones que expresan el transgén v-Ha-ras (Leder *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 9178-9182 (1990)).

En aún otra realización, pueden usarse proteínas de fusión de la presente invención para tratar la inflamación. Por ejemplo, en realizaciones alternativas, la proteína de fusión de la presente invención se usa para tratar la inflamación asociada con autoinmunidad, inflamación asociada con enfermedad inflamatoria del intestino, inflamación asociada con artritis reumatoide, inflamación asociada con psoriasis, inflamación asociada con esclerosis múltiple, inflamación asociada con hipoxia, inflamación asociada con accidente cerebrovascular, inflamación asociada con infarto de miocardio, inflamación asociada con choque hemorrágico, inflamación asociada con septicemia, inflamación asociada con trasplante de órgano o inflamación asociada con cicatrización de heridas alterada.

Por ejemplo, tras un tratamiento trombolítico, células inflamatorias tales como granulocitos infiltran el tejido isquémico y producen radicales oxígeno que pueden destruir más células de las que se destruyeron por la hipoxia. Se ha mostrado que inhibir el receptor en los neutrófilos responsable de que los neutrófilos puedan infiltrar el tejido con anticuerpos u otros antagonistas proteicos mejora la respuesta. Dado que RAGE es un ligando para este receptor de neutrófilos, una proteína de fusión que contiene un fragmento de RAGE puede actuar como señuelo y prevenir que los neutrófilos circulen al sitio sometido a reperusión y por tanto prevenir una destrucción tisular adicional. El papel de RAGE en la prevención de la inflamación puede indicarse mediante estudios que muestran que RAGEs inhibió la expansión de la neoíntima en un modelo de rata de reestenosis tras lesión arterial en ratas tanto diabéticas como normales, supuestamente inhibiendo la proliferación endotelial, de células del músculo liso y la activación de macrófagos mediante RAGE (Zhou *et al.*, Circulation, 107:2238-2243 (2003)). Además, RAGEs inhibió modelos de inflamación incluyendo hipersensibilidad de tipo retardado, encefalitis autoinmunitaria experimental y enfermedad inflamatoria del intestino (Hofinan *et al.*, Cell, 97:889-901 (1999)).

Además, en una realización, las proteínas de fusión de la presente invención pueden usarse para tratar trastornos con base autoinmunitaria. Por ejemplo, las proteínas de fusión de la presente invención pueden usarse para tratar la insuficiencia renal. Por tanto, las proteínas de fusión de la presente invención pueden usarse para tratar la nefritis de lupus sistémico o nefritis de lupus inflamatorio. Por ejemplo, se ha mostrado que S100/calgranulinas comprenden una familia de polipéptidos de unión a calcio estrechamente relacionados caracterizados por dos regiones de mano EF unidas mediante un péptido de conexión (Schafer *et al.*, TIBS, 21:134-140 (1996); Zimmer *et al.*, Brain Res. Bull., 37:417-429 (1995); Rammes *et al.*, J. Biol. Chem., 272:9496-9502 (1997); Luger *et al.*, Eur. J. Clin. Invest., 25:659-664 (1995)). Aunque carecen de péptidos señal, se ha sabido desde hace mucho tiempo que S100/calgranulinas acceden al espacio extracelular, especialmente en sitios de respuestas inmunitarias/inflamatorias crónicas, como en fibrosis quística y artritis reumatoide. RAGE es un receptor para muchos miembros de la familia de S100/calgranulina, que media en sus efectos proinflamatorios sobre células tales como linfocitos y fagocitos mononucleares. Además, estudios sobre la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado, colitis en ratones nulos para IL-10, artritis inducida por colágeno y modelos de encefalitis autoinmunitaria experimental sugieren que la interacción RAGE-ligando (supuestamente con S-100/calgranulinas) tiene un papel proximal en la cascada inflamatoria.

Por tanto, en el presente documento se da a conocer un método para inhibir la interacción de un AGE con RAGE en un sujeto administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de la presente invención. El sujeto tratado usando las proteínas de fusión de RAGE de la presente invención puede ser un animal. En una realización, el sujeto es un ser humano. El sujeto puede padecer una enfermedad relacionada con AGE tal como diabetes, complicaciones diabéticas tales como nefropatía, neuropatía, retinopatía, úlcera de pie, amiloidosis o insuficiencia renal, e inflamación. O, el sujeto puede ser un individuo con enfermedad de Alzheimer. En una realización alternativa, el sujeto puede ser un individuo con cáncer. En aún otras realizaciones, el sujeto puede padecer lupus eritematoso sistémico o nefritis de lupus inflamatorio. Otras enfermedades pueden estar mediadas por RAGE y, por tanto, pueden tratarse usando las proteínas de fusión de la presente invención. Por tanto, en realizaciones alternativas adicionales de la presente invención, las proteínas de fusión pueden usarse para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, artritis, vasculitis, nefropatías, retinopatías y neuropatías en sujetos humanos o animales.

Una cantidad terapéuticamente eficaz puede comprender una cantidad que puede prevenir la interacción de RAGE con un AGE u otros tipos de ligandos de RAGE endógenos en un sujeto. Por consiguiente, la cantidad variará con el sujeto que está tratándose. La administración del compuesto puede ser horaria, diaria, semanal, mensual, anual o como un único acontecimiento. En diversas realizaciones alternativas, la cantidad eficaz de la proteína de fusión puede oscilar entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, o entre aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal o entre aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. La cantidad eficaz real puede establecerse mediante ensayos de dosis/respuesta usando métodos convencionales en la técnica (Johnson *et al.*, Diabetes. 42: 1179, (1993)). Por tanto, tal como conocen aquellos en la técnica, la cantidad eficaz puede depender de la biodisponibilidad, bioactividad y biodegradabilidad del compuesto.

Composiciones

La presente invención puede comprender una composición que comprende una proteína de fusión de la presente invención mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. La proteína de fusión comprende un polipéptido de RAGE unido a un segundo polipéptido distinto de RAGE. La proteína de fusión comprende un sitio de unión a ligando de RAGE. En una realización, el sitio de unión a ligando comprende el dominio más N-terminal de la proteína de fusión. El sitio de unión a ligando de RAGE puede comprender el dominio V de RAGE o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión a ligando de RAGE comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma.

El polipéptido de RAGE está unido a un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción (por ejemplo, un fragmento del mismo) de un dominio de inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina comprende al menos una porción de al menos uno de los dominios C_H2 o C_H3 de una IgG humana.

La proteína o el polipéptido de RAGE puede comprender RAGE humano de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) o un fragmento de RAGE humano. En una realización, el polipéptido de RAGE no incluye ningún residuo de secuencia señal. La secuencia señal de RAGE puede comprender o bien los residuos 1-22 o bien los residuos 1-23 de RAGE de longitud completa (SEQ ID NO: 1). En realizaciones alternativas, el polipéptido de RAGE puede comprender una secuencia que es idéntica en un 70%, en un 80% o en un 90% a RAGE humano o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido de RAGE puede comprender RAGE humano o un fragmento del mismo, con glicina como primer residuo en vez de metionina (véase por ejemplo, Neeper *et al.*, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGE de longitud completa con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3) (figuras 1A y 1B) o una porción de esa secuencia de aminoácidos. Las proteínas de fusión de la presente invención también pueden comprender RAGEs (por ejemplo, SEQ ID NO: 4), un polipéptido idéntico en un 90% a RAGEs o un fragmento de RAGEs. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender

RAGEs humano o un fragmento del mismo, con glicina como primer residuo en vez de metionina (véase por ejemplo, Neeper *et al.*, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGEs con la secuencia señal eliminada (por ejemplo, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) (figura 1C) o una porción de esa secuencia de aminoácidos. En otras realizaciones, la proteína RAGE puede comprender un dominio V (por ejemplo, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; figura 1D). O, puede usarse una secuencia idéntica en un 90% al dominio V o un fragmento del mismo. O, la proteína RAGE puede comprender un fragmento de RAGE que comprende una porción del dominio V (por ejemplo, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, figura 1D). En una realización, el sitio de unión a ligando puede comprender SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica en un 90% a la misma. En aún otra realización, el fragmento de RAGE es un péptido sintético.

Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-116 de RAGE humano (SEQ ID NO: 7) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-116 de RAGE humano (SEQ ID NO: 8) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V de RAGE. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 124-221 de RAGE humano (SEQ ID NO: 11) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio C1 de RAGE. En otra realización, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 227-317 de RAGE humano (SEQ ID NO: 12) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio C2 de RAGE. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-123 de RAGE humano (SEQ ID NO: 13) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-123 de RAGE humano (SEQ ID NO: 14) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V de RAGE y al ligador interdominio en el sentido C-terminal. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-226 de RAGE humano (SEQ ID NO: 17) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o los aminoácidos 24-226 de RAGE humano (SEQ ID NO: 18) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V, el dominio C1 y el ligador interdominio que une esos dos dominios. O, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 5) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, o 24-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 6) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente a RAGEs (es decir, que codifican para los dominios V, C1 y C2 y ligadores interdominios). O, pueden usarse fragmentos de cada una de estas secuencias.

La proteína de fusión puede incluir varios tipos de péptidos que no se derivan de RAGE o un fragmento del mismo. El segundo polipéptido de la proteína de fusión comprende un polipéptido derivado de una inmunoglobulina. La cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los isotipos conocidos de cadena pesada: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ) o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) puede derivarse de uno cualquiera de los subtipos conocidos de cadena pesada: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. El segundo polipéptido puede comprender los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana o una porción de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como realizaciones a modo de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana o una porción de los mismos puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40. El péptido de inmunoglobulina puede codificarse por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.

La porción Fc de la cadena de inmunoglobulina puede ser proinflamatoria *in vivo*. Por tanto, la proteína de fusión de RAGE de la presente invención comprende un ligador interdominio derivado de RAGE en vez de un polipéptido bisagra interdominio derivado de una inmunoglobulina.

Por tanto en una realización, la proteína de fusión puede comprender además un polipéptido de RAGE directamente unido a un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina o un fragmento del mismo. En una realización, el dominio C_H2, o un fragmento del mismo, comprende SEQ ID NO: 42.

El polipéptido de RAGE comprende un ligador interdominio de RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE de tal manera que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido N-terminal del ligador interdominio, y el aminoácido C-terminal del ligador interdominio de RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina o un fragmento del mismo. El polipéptido que comprende un dominio C_H2 de una inmunoglobulina, o una porción del mismo, puede comprender los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana. Como realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios C_H2 y C_H3 de una IgG1 humana puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

La proteína de fusión de la presente invención puede comprender un único dominio o múltiples dominios de RAGE. Además, el polipéptido de RAGE que comprende un ligador interdominio unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE puede comprender un fragmento de una proteína RAGE de longitud completa. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede comprender dos dominios de inmunoglobulina derivados de proteína RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. La proteína de fusión puede comprender un primer dominio de inmunoglobulina de RAGE y un primer ligador interdominio unido a un segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE y un segundo ligador interdominio de RAGE, de tal manera que el aminoácido N-terminal del primer ligador interdominio está unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de inmunoglobulina de RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido C-terminal del primer ligador interdominio, el aminoácido N-terminal del segundo ligador interdominio

está unido al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE y el aminoácido C-terminal del segundo ligador interdominio de RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal del polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H2 o fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 19) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma o los aminoácidos 24-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 20) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma, correspondiente al dominio V, el dominio C1, el ligador interdominio que une estos dos dominios y un segundo ligador interdominio en el sentido C-terminal de C1. En una realización, un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 30 o un fragmento del mismo puede codificar para una proteína de fusión de RAGE de cuatro dominios.

Alternativamente, una proteína de fusión de tres dominios puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido de Fc humano. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un único dominio de inmunoglobulina de RAGE por medio de un ligador interdominio de RAGE al aminoácido N-terminal del polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H2 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido de RAGE puede comprender los aminoácidos 23-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 15) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma o los aminoácidos 24-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 16) o una secuencia idéntica en un 90% a la misma correspondiente al dominio V de RAGE y un ligador interdominio en el sentido C-terminal. En una realización, un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 31 o un fragmento del mismo puede codificar para una proteína de fusión de RAGE de tres dominios.

Un fragmento de ligador interdominio de RAGE puede comprender una secuencia peptídica que está de manera natural en el sentido C-terminal de, y por tanto, unida a, un dominio de inmunoglobulina de RAGE. Por ejemplo, para el dominio V de RAGE, el ligador interdominio puede comprender secuencias de aminoácidos que están de manera natural en el sentido C-terminal del dominio V. En una realización, el ligador puede comprender SEQ ID NO: 21, correspondiente a los aminoácidos 117-123 de RAGE de longitud completa. O, el ligador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia de RAGE natural. Por ejemplo, puede usarse un ligador interdominio que comprende varios aminoácidos (por ejemplo, 1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos) en el sentido N-terminal y en el sentido C-terminal de SEQ ID NO: 21. Por tanto, en una realización, el ligador interdominio comprende SEQ ID NO: 23 que comprende los aminoácidos 117-136 de RAGE de longitud completa. O, pueden usarse fragmentos de SEQ ID NO: 21 delecionando, por ejemplo, 1, 2 ó 3 aminoácidos de cualquier extremo del ligador. En realizaciones alternativas, el ligador puede comprender una secuencia que es idéntica en un 70% o idéntica en un 80% o idéntica en un 90% a SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 23.

Para el dominio C1 de RAGE, el ligador puede comprender una secuencia peptídica que está de manera natural en el sentido C-terminal del dominio C1. En una realización, el ligador puede comprender SEQ ID NO: 22, correspondiente a los aminoácidos 222-251 de RAGE de longitud completa. O, el ligador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia de RAGE natural. Por ejemplo, puede usarse un ligador que comprende varios aminoácidos (1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos) en el sentido N-terminal y en el sentido C-terminal de SEQ ID NO: 22. O, pueden usarse fragmentos de SEQ ID NO: 22, delecionando por ejemplo, 1-3, 1-5 ó 1-10 ó 1-15 aminoácidos de cualquier extremo del ligador. Por ejemplo, en una realización, un ligador interdominio de RAGE puede comprender SEQ ID NO: 24, correspondiente a los aminoácidos 222-226. O un ligador interdominio puede comprender SEQ ID NO: 44, correspondiente a los aminoácidos 318-342 de RAGE.

Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender cualquiera de los portadores farmacéuticamente aceptados convencionales conocidos en la técnica. El portador puede comprender un diluyente. En una realización, el portador farmacéutico puede ser un líquido y la proteína de fusión o el constructo de ácido nucleico puede estar en forma de una disolución. En otra realización, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido en forma de un polvo, un polvo liofilizado o un comprimido. O, el portador farmacéutico puede ser un gel, supositorio o crema. En realizaciones alternativas, el portador puede comprender un liposoma, una microcápsula, una célula o un virus encapsulado en polímero. Por tanto, el término portador farmacéuticamente aceptable abarca, pero no se limita a, cualquiera de los portadores farmacéuticamente aceptados convencionales, tales como agua, alcoholes, solución salina tamponada con fosfato, azúcares (por ejemplo, sacarosa o manitol), aceites o emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua o una emulsión de triglicéridos, diversos tipos de agentes humectantes, comprimidos, comprimidos recubiertos y cápsulas.

La administración de las proteínas de fusión de RAGE de la presente invención puede emplear diversas vías. Por tanto, la administración de la proteína de fusión de RAGE de la presente invención puede emplear inyección intraperitoneal (i.p.). Alternativamente, la proteína de fusión de RAGE puede administrarse por vía oral, intranasal o como aerosol. En otra realización, la administración es intravenosa (i.v.). La proteína de fusión de RAGE también puede inyectarse por vía subcutánea. En otra realización, la administración de la proteína de fusión es intraarterial. En otra realización, administración es sublingual. Además, la administración puede emplear una cápsula de liberación en el tiempo. En aún otra realización, la administración puede ser transrectal, como mediante un supositorio o similar. Por ejemplo, la administración subcutánea puede ser útil para tratar trastornos crónicos cuando es deseable la administración por el propio paciente.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una disolución inyectable estéril en un vehículo o disolvente parenteralmente aceptable, no tóxico. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, 3-butanodiol, disolución isotónica de cloruro de sodio o tampones acuosos, tales como por ejemplo, tampones citrato, acetato, glicina, histidina, fosfato, tris o succinato fisiológicamente aceptables.

La disolución inyectable puede contener estabilizadores para proteger frente a la degradación química y la formación de agregados. Los estabilizadores pueden incluir antioxidantes tales como hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT), tampones (citratos, glicina, histidina) o tensioactivos (polisorbato 80, poloxámeros). La disolución también puede contener conservantes antimicrobianos, tales como alcohol bencílico y parabenos. La disolución también puede contener tensioactivos para reducir la agregación, tales como polisorbato 80, poloxámero u otros tensioactivos conocidos en la técnica. La disolución también puede contener otros aditivos, tales como un azúcar/azúcares o solución salina, para ajustar la presión osmótica de la composición para que sea similar a la sangre humana.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de un polvo liofilizado estéril para inyección tras la reconstitución con un diluyente. El diluyente puede ser agua para inyección, agua bacteriostática para inyección o solución salina estéril. El polvo liofilizado puede producirse mediante secado por congelación de una disolución de la proteína de fusión para producir la proteína en forma seca. Tal como se conoce en la técnica, la proteína liofilizada tiene generalmente una estabilidad aumentada y una mayor vida útil de almacenamiento que una disolución líquida de la proteína. El polvo liofilizado (torta) puede contener un tampón para ajustar el pH, tal como por ejemplo tampón citrato, acetato, glicina, histidina, fosfato, tris o succinato fisiológicamente aceptable. El polvo liofilizado también puede contener lioprotectores para mantener su estabilidad física y química. Los lioprotectores comúnmente usados son azúcares no reductores y disacáridos tales como sacarosa, manitol o trehalosa. El polvo liofilizado puede contener estabilizadores para proteger frente a la degradación química y la formación de agregados. Los estabilizadores pueden incluir, pero no se limitan a antioxidantes (BHA, BHT), tampones (citratos, glicina, histidina) o tensioactivos (polisorbato 80, poloxámeros). El polvo liofilizado también puede contener conservantes antimicrobianos, tales como alcohol bencílico y parabenos. El polvo liofilizado también puede contener tensioactivos para reducir la agregación, tales como, pero sin limitarse a, polisorbato 80 y poloxámero. El polvo liofilizado también puede contener aditivos (por ejemplo, azúcares o solución salina) para ajustar la presión osmótica para que sea similar a la sangre humana tras la reconstitución del polvo. El polvo liofilizado también puede contener agentes de carga, tales como azúcares y disacáridos.

Las composiciones farmacéuticas para inyección también pueden estar en forma de una suspensión oleaginosa. Esta suspensión puede formularse según los métodos conocidos usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados tal como se describió anteriormente. Además, se emplean convenientemente aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Con este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido usando mono o diglicéridos sintéticos. Además, pueden formularse suspensiones aceitosas suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco o en un aceite mineral tal como una parafina líquida. Por ejemplo, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de productos inyectables. Las suspensiones aceitosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina sólida o alcohol cetílico. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua o suspensiones acuosas. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete o un aceite mineral, por ejemplo una parafina líquida o una mezcla de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas que se producen de manera natural, por ejemplo goma arábiga o goma tragacanto, fosfátidos que se producen de manera natural, por ejemplo semilla de soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitano, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo polioxietilensorbitano.

Las suspensiones acuosas también pueden contener los compuestos activos en mezcla con excipientes. Tales excipientes pueden incluir agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes de dispersión o humectantes, tales como un fosfátido que se produce de manera natural tal como lecitina o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tales como monooleato de polioxietilensorbitol o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilensorbitano.

Los polvos dispersables y gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua pueden proporcionar el compuesto activo en mezcla con un agente de dispersión, agente de suspensión y uno o más conservantes. Anteriormente se describieron conservantes, agentes de dispersión y agentes de suspensión adecuados.

Las composiciones también pueden estar en forma de supositorios para administración rectal de los compuestos de

la invención. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente adecuado no irritante que es sólido a temperaturas habituales pero líquido a la temperatura rectal y por tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles, por ejemplo.

- 5 Para uso tópico, pueden usarse cremas, pomadas, jaleas, disoluciones o suspensiones que contienen los compuestos de la invención. Las aplicaciones tópicas también pueden incluir enjuagues bucales y gárgaras. Pueden usarse conservantes, antioxidantes tales como BHA y BHT, dispersantes, tensioactivos o tampones adecuados.

- 10 Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de administración de liposoma, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Pueden formarse liposomas a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

- 15 En determinadas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden modificarse para retrasar adicionalmente el aclaramiento de la circulación mediante enzimas metabólicas. En una realización, los compuestos pueden modificarse mediante la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol (PEG), copolímeros de PEG y polipropilenglicol, polivinilpirrolidona o poliprolina, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico) y similares. Tales modificaciones también pueden aumentar la solubilidad del compuesto en disolución acuosa. Pueden unirse de manera covalente polímeros tales como PEG a uno o más residuos amino reactivo, residuos sulfhidrilo o residuos carboxilo. Se han descrito numerosas formas activadas de PEG, incluyendo ésteres
- 20 activos de ácido carboxílico o derivados de carbonato, particularmente aquellas en las que los grupos salientes son N-hidroxysuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenzeno-3-sulfona para su reacción con grupos amino, derivados de haloacetilo o multimodales para su reacción con grupos sulfhidrilo, y derivados de aminohidrazina o hidrazida para su reacción con grupos carbohidrato.

- 25 En las patentes estadounidenses n.^{os} 6.267.958 y 5.567.677 se describen métodos adicionales para la preparación de formulaciones de proteínas que pueden usarse con las proteínas de fusión de la presente invención.

- 30 En un aspecto adicional, los moduladores de RAGE de la invención se utilizan en tratamientos de terapia adyuvante o terapia de combinación con otros agentes terapéuticos conocidos. Lo siguiente es una lista no exhaustiva de adyuvantes y agentes terapéuticos adicionales que pueden usarse en combinación con los moduladores de proteína de fusión de RAGE de la presente invención:

Clasificaciones farmacológicas de agentes anticancerígenos:

- 35 1. Agentes alquilantes: ciclofosfamida, nitrosoureas, carboplatino, cisplatino, procarbazona
2. Antibióticos: bleomicina, daunorubicina, doxorubicina
- 40 3. Antimetabolitos: metotrexato, citarabina, fluorouracilo
4. Alcaloides vegetales: vinblastina, vincristina, etopósido, paclitaxel
5. Hormonas: tamoxifeno, acetato de octreotida, finasterida, flutamida
- 45 6. Modificadores de la respuesta biológica: interferones, interleucinas

Clasificaciones farmacológicas del tratamiento para artritis reumatoide

- 50 1. Analgésicos: aspirina
2. AINE (antiinflamatorios no esteroideos): ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco
3. FARME (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad): metotrexato, preparaciones de oro, hidroxycloroquina, sulfasalazina
- 55 4. Modificadores de la respuesta biológica, FARME: etanercept, infliximab, glucocorticoides

Clasificaciones farmacológicas del tratamiento para la diabetes mellitus

- 60 1. Sulfonilureas: tolbutamida, tolazamida, gliburida, glipizida
2. Biguanidas: metformina
- 65 3. Diversos agentes orales: acarbosa, troglitazona

4. Insulina

Clasificaciones farmacológicas del tratamiento para la enfermedad de Alzheimer

1. Inhibidor de la colinesterasa: tacrina, donepezilo
2. Antipsicóticos: haloperidol, tioridazina
3. Antidepresivos: desipramina, fluoxetina, trazodona, paroxetina
4. Anticonvulsivos: carbamazepina, ácido valproico

En el presente documento se da a conocer un método de tratamiento de enfermedades mediadas por RAGE, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de RAGE en combinación con agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales, antibióticos, hormonas, modificadores de la respuesta biológica, analgésicos, AINE, FARME, glucocorticoides, sulfonilureas, biguanidas, insulina, inhibidores de la colinesterasa, antipsicóticos, antidepresivos y anticonvulsivos. En una realización adicional, la presente invención proporciona la composición farmacéutica de la invención tal como se describió anteriormente, que comprende además uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales, antibióticos, hormonas, modificadores de la respuesta biológica, analgésicos, AINE, FARME, glucocorticoides, sulfonilureas, biguanidas, insulina, inhibidores de la colinesterasa, antipsicóticos, antidepresivos y anticonvulsivos.

Ejemplos

Las características y ventajas del concepto inventivo cubierto por la presente invención se ilustran adicionalmente en los ejemplos que siguen.

Ejemplo 1: Producción de proteínas de fusión de RAGE-Fc de IgG

Se construyeron dos plásmidos para expresar proteínas de fusión de RAGE-Fc de IgG. Se construyeron ambos plásmidos ligando diferentes longitudes de una secuencia de ADNc en 5' de RAGE humano con la misma secuencia de ADNc en 3' de Fc de IgG humana ($\gamma 1$). Se insertaron entonces estas secuencias de expresión (es decir, productos de ligamiento) en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen, CA). Las secuencias de ácido nucleico que codifican para la región que codifica para la proteína de fusión se muestran en las figuras 2 y 3. Para la proteína de fusión TTP-4000, la secuencia de ácido nucleico desde 1 hasta 753 (destacada en negrita) codifica para la secuencia de proteína N-terminal de RAGE, mientras que la secuencia de ácido nucleico desde 754 hasta 1386 codifica para la secuencia de proteína Fc de IgG (figura 2). Para TTP-3000, la secuencia de ácido nucleico desde 1 hasta 408 (destacada en negrita) codifica para la secuencia de proteína N-terminal de RAGE, mientras que la secuencia de ácido nucleico desde 409 hasta 1041 codifica para la secuencia de proteína Fc de IgG (figura 3).

Para producir las proteínas de fusión de RAGE, se transfectaron de manera estable los vectores de expresión que comprenden las secuencias de ácido nucleico de o bien SEQ ID NO: 30 o bien SEQ ID NO: 31 en células CHO. Se seleccionaron transformantes positivos para resistencia a neomicina conferida mediante el plásmido y se clonaron. Se expandieron clones de alta producción tal como se detectaron mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western y se purificó el producto génico mediante cromatografía de afinidad usando columnas de proteína A. Se optimizó la expresión de modo que las células estuviesen produciendo TTP-4000 recombinante a niveles de aproximadamente 1,3 gramos por litro.

Los polipéptidos expresados que codifican para las dos proteínas de fusión se ilustran en las figuras 4-6. Para la estructura de cuatro dominios de TTP-4000, los primeros 251 aminoácidos (mostrados en negrita en la figura 4) contienen una secuencia señal (1-22/23), el dominio de inmunoglobulina V (y de unión a ligando) (23/24-116), un segundo ligador interdominio (117-123), un segundo dominio de inmunoglobulina (C_H1) (124-221) y un segundo ligador (222-251) de la proteína RAGE humana (figuras 4, 6B). La secuencia desde 252 hasta 461 incluye los dominios de inmunoglobulina C_H2 y C_H3 de IgG.

Para la estructura de tres dominios de TTP-3000, los primeros 136 aminoácidos (mostrados en negrita) contienen una secuencia señal (1-22/23), el dominio de inmunoglobulina V (y de unión a ligando) (23/24-116) y una secuencia de ligador interdominio (117-136) de la proteína RAGE humana (figuras 5, 6B). Además, para TT3, la secuencia desde 137 hasta 346 incluye los dominios de inmunoglobulina C_H2 y C_H3 de IgG.

Ejemplo 2: Método para someter a prueba la actividad de una proteína de fusión de RAGE-IgG1A. Unión a ligando *in vitro*:

Se recubrieron ligandos de RAGE conocidos sobre la superficie de placas Maxisorb a una concentración de 5 microgramos por pocillo. Se incubaron las placas a 4°C durante la noche. Tras la incubación con ligando, se aspiraron las placas y se añadió un tampón de bloqueo de BSA al 1% en tampón imidizol 50 mM (pH 7,2) a las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces se aspiraron las placas y/o se lavaron con tampón de lavado (imidizol 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05%, CaCl₂ 5 mM y MgCl₂ 5 mM, pH 7,2). Se prepararon una disolución de TTP-3000 (TT3) a una concentración inicial de 1,082 mg/ml y una disolución de TTP-4000 (TT4) a una concentración inicial de 370 µg/ml. Se añadió la proteína de fusión a diluciones crecientes de la muestra inicial. Se permitió que la proteína de fusión de RAGE se incubase con el ligando inmovilizado a 37°C durante una hora tras lo cual se lavó la placa y se sometió a ensayo para detectar la unión de la proteína de fusión. Se detectó la unión mediante la adición de un complejo de inmunodetección que contenía un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG1 humana diluido 1:11.000 hasta una concentración de ensayo final (FAC) de 21 ng/100 µl, un anticuerpo de cabra biotinilado anti-IgG de ratón diluido 1:500, a una FAC de 500 ng/µl y una fosfatasa alcalina unida a avidina. Se incubó el complejo con la proteína de fusión inmovilizada durante una hora a temperatura ambiente tras lo cual se lavó la placa y se añadió el sustrato de fosfatasa alcalina fosfato de para-nitrofenilo (PNPP). Se cuantificó la unión del complejo a la proteína de fusión inmovilizada midiendo la conversión de PNPP en para-nitrofenol (PNP) que se midió espectrofotométricamente a 405 nm.

Tal como se ilustra en la figura 7, las proteínas de fusión TTP-4000 (TT4) y TTP-3000 (TT3) interaccionan específicamente con los ligandos de RAGE conocidos amiloide beta (Abeta), S100b (S100) y anfoterina (Ampho). En ausencia de ligando, es decir, recubrimiento con BSA sola (BSA o BSA + lavado), no hubo aumento en la absorbancia por encima de niveles atribuibles a unión no específica del complejo de inmunodetección. Cuando se usa amiloide beta como ligando marcado, puede ser necesario preincubar el amiloide beta antes del ensayo. La preincubación puede permitir que el amiloide beta se autoagregue en forma de lámina plegada, ya que el amiloide beta puede unirse preferentemente a RAGE en forma de una lámina plegada.

Se muestran a modo de ejemplo pruebas adicionales de una interacción específica entre las proteínas de fusión de RAGE TTP-4000 y TTP-3000 con ligandos de RAGE en estudios que muestran que un ligando de RAGE puede competir eficazmente con un ligando de RAGE conocido por la unión a las proteínas de fusión. En estos estudios, se inmovilizó amiloide beta (A-beta) sobre una placa Maxisorb y se añadió la proteína de fusión tal como se describió anteriormente. Además, se añadió un ligando de RAGE a algunos de los pocillos al mismo tiempo que la proteína de fusión.

Se encontró que el ligando de RAGE podía bloquear la unión de TTP-4000 (TT4) en de aproximadamente el 25% al 30% cuando estaba presente TTP-4000 a 123 µg/ml (dilución 1:3, figura 8). Cuando la disolución inicial de TTP-4000 se diluyó en un factor de 10 ó 30 (1:10 ó 1:30), la unión de la proteína de fusión al ligando inmovilizado se inhibía completamente por el ligando de RAGE. De manera similar, el ligando de RAGE bloqueaba la unión de TTP-3000 (TT3) en aproximadamente el 50% cuando estaba presente TTP-3000 a 360 µg/ml (dilución 1:3, figura 9). Cuando la disolución inicial de TTP-3000 se diluyó en un factor de 10 (1:10), la unión de la proteína de fusión al ligando inmovilizado se inhibió completamente por el ligando de RAGE. Por tanto, la especificidad de unión de la proteína de fusión de RAGE al ligando de RAGE era dependiente de la dosis. Además, tal como se muestra en las figuras 8 y 9, no había esencialmente unión detectada en ausencia de proteína de fusión, es decir, usando sólo el complejo de inmunodetección ("complejo solo").

B. Efecto de proteínas de fusión de RAGE en un ensayo basado en células

El trabajo previo ha mostrado que las células THP-1 mieloides pueden secretar TNF-α, en respuesta a ligandos de RAGE. En este ensayo, se cultivaron células THP-1 en medios RPMI-1640 complementados con FBS al 10% usando un protocolo proporcionado por la ATCC. Se indujeron las células para que secretaran TNF-α por medio de estimulación de RAGE con S100b 0,1 mg/ml tanto en ausencia como en presencia de las proteínas de fusión TTP-3000 (TT3) o TTP-4000 (TT4) (10 µg), RAGEs (10 µg) y una IgG humana (10 µg) (es decir, como control negativo). Se midió la cantidad de TNF-α secretada por las células THP-1 24 horas tras la adición de las proteínas al cultivo celular usando un kit de ELISA disponible comercialmente para TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los resultados en la figura 10 demuestran que las proteínas de fusión inhiben la producción de TNF-α inducida por S100b/RAGE en estas células. Tal como se muestra en la figura 10, tras la adición de 10 µg de proteína de fusión de RAGE TTP-3000 o TTP-4000, la inducción de TNF-α por S100b (FAC 0,1 mg/ml) se redujo en de aproximadamente el 45% al 70%, respectivamente. La proteína de fusión TTP-4000 puede ser al menos tan eficaz en el bloqueo de la inducción de TNF-α por S100b como lo es RAGEs (figura 10). La especificidad de la inhibición para las secuencias de RAGE de TTP-4000 y TTP-3000 se muestra mediante el experimento en el que se añadió IgG sola a células estimuladas con S100b. La adición de IgG y S100b al ensayo muestra los mismos niveles de TNF-α que S100b solo. La especificidad de la inhibición de la inducción de TNF-α por TTP-4000 y TTP-3000 para secuencias de RAGE de la proteína de fusión se muestra mediante un experimento en el que se añadió IgG sola a células estimuladas con S100b. Puede observarse que la adición de IgG, es decir, IgG humana sin la secuencia de RAGE (IgG humana de Sigma añadida a 10 µg/pocillo), y S100b al ensayo muestra los mismos niveles de TNF-α que S100b solo.

Ejemplo 3: Perfil farmacocinético de TTP-4000

Para determinar si TTP-4000 tendría un perfil farmacocinético superior en comparación con RAGEs humano, se les administró a ratas y primates no humanos una inyección intravenosa (i.v.) de TTP-4000 (5 mg/kg) y entonces se sometió a ensayo el plasma para detectar la presencia de TTP-4000. En estos experimentos, dos monos macho sin tratamiento previo recibieron una única dosis de bolo i.v. de TTP-4000 (5 mg/ml/kg) en una vena periférica seguido por un lavado con solución salina de aproximadamente 1,0 mililitros (ml). Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 1,0 ml) antes de la dosis (es decir, antes de la inyección de la TTP-4000), o a 0,083, 0,25, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 288 y 336 horas tras la dosis en tubos que contenían (heparina de litio). Tras la recogida, se colocaron los tubos sobre hielo húmedo (máximo 30 minutos) hasta la centrifugación bajo refrigeración (a de 2 a 8°C) a 1500 x g durante 15 minutos. Entonces se almacenó cada muestra de plasma recogida en congelación (-70°C ± 10°C) hasta que se sometió a ensayo para detectar polipéptido de RAGE usando un ELISA a diversos puntos de tiempo tras la inyección, tal como se describe en el ejemplo 6.

El perfil cinético mostrado en la figura 11 revela que una vez que TTP-4000 ha saturado sus ligandos tal como se demuestra por la pendiente bastante pronunciada de la fase alfa en 2 animales, conserva una semivida terminal de más de 300 horas. Esta semivida es significativamente mayor que la semivida de RAGEs humano en plasma (generalmente de aproximadamente 2 horas) y proporciona una oportunidad para inyecciones únicas para indicaciones agudas y semicrónicas. En la figura 11 cada curva representa un animal diferente en las mismas condiciones experimentales.

Ejemplo 4: Activación de Fc por TTP-4000

Se realizaron experimentos para medir la activación del receptor de Fc por la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 en comparación con IgG humana. Se midió la activación del receptor de Fc midiendo la secreción de TNF- α a partir de células THP-1 que expresan el receptor de Fc. En estos experimentos, se recubrió una placa de 96 pocillos con 10 μ g/pocillo de TTP-4000 o IgG humana. La estimulación de Fc da como resultado secreción de TNF- α . Se midió la cantidad de TNF- α mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Por tanto, en este ensayo, se mantuvo la línea celular mieloide, THP-1 (n.º de la ATTC TIB-202) en medios RPMI-1640 complementados con suero bovino fetal al 10% según las instrucciones de la ATCC. Normalmente, se indujeron 40.000-80.000 células por pocillo para que secretaran TNF-alfa por medio de estimulación del receptor de Fc recubriendo previamente el pocillo con 10 μ g/pocillo de o bien TTP-4000 agregada con calor (63°C durante 30 min) o bien IgG1 humana. Se midió la cantidad de TNF-alfa secretada por las células THP-1 en sobrenadantes recogidos de cultivos de 24 horas de células en los pocillos tratados usando un kit de ELISA de TNF disponible comercialmente (R&D Systems, Minneapolis, MN n.º DTA00C) según las instrucciones.

Se muestran los resultados en la figura 12 en la que puede observarse que TTP-4000 genera menos de 2 ng/pocillo de TNF e IgG generaba más de 40 ng/pocillo.

Ejemplo 5: Actividad *in vivo* de TTP-4000

Se comparó la actividad de TTP-4000 con RAGEs en varios modelos *in vivo* de enfermedad humana.

A. TTP-4000 en un modelo animal de reestenosis

Se evaluó la proteína de fusión de RAGE TTP-4000 en un modelo de rata diabética de reestenosis que implicaba medir la proliferación de músculo liso y la expansión de la íntima 21 días tras una lesión vascular. En estos experimentos, se realizó una lesión con balón de la arteria carótida común en ratas diabéticas y no diabéticas Zucker usando un procedimiento convencional. Se administró por vía intraperitoneal (i.p.) una dosis de carga (3 mg/rata) de IgG, TTP-4000 o solución salina tamponada con fosfato (PBS) un día antes de la lesión. Se administró una dosis de mantenimiento cada dos días hasta el día 7 tras la lesión (es decir, el día 1, 3, 5 y 7 tras la lesión). La dosis de mantenimiento era alta = 1 mg/animal para un grupo, o baja = 0,3 mg/animal para el segundo grupo. Para medir la proliferación de células de músculo liso vascular (CMLV), se sacrificaron los animales a los 4 días y 21 días tras la lesión.

Para la medición de la proliferación celular, los animales de 4 días recibieron una inyección intraperitoneal de bromodesoxiuridina (BrdU) 50 mg/kg a 18, 12 y 2 horas antes de la eutanasia. Tras el sacrificio, se recogieron las arterias carótidas izquierda y derecha completas. Se almacenaron muestras en Histochoice durante al menos 24 horas antes de incrustar. Se realizó la evaluación de la proliferación CMLV usando anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU. Se aplicó un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón marcado con fluorescencia. Se contó el número de núcleos positivos para BrdU por sección por dos observadores ciegos para los regímenes de tratamiento.

Se sacrificaron las ratas restantes a los 21 días para el análisis morfométrico. Se realizaron análisis morfométricos por un observador ciego para los grupos de estudio, usando el software de planimetría microscópica digital informatizada Image-Pro Plus sobre secciones en serie (separadas 5 mm) de arterias carótidas teñidas mediante

tinción de Van Gieson. Se expresaron todos los datos como la media $\pm$ DE. Se realizó el análisis estadístico con el uso del software SPSS. Se compararon variables continuas usando pruebas de la t para datos independientes. Se consideró que un valor de $P \leq 0,05$ era estadísticamente significativo.

- 5 Tal como se observa en las figuras 13A y 13B, el tratamiento con TTP-4000 redujo significativamente la razón de íntima/media y la proliferación de células de músculo liso vascular de un modo sensible a la dosis. En la figura 13 B, el eje y representa el número de células en proliferación con BrdU.

B. TTP4000 en un modelo animal de EA

- 10 Se realizaron experimentos para evaluar si TTP-4000 podía afectar a la formación de amiloide y la disfunción cognitiva en un modelo de ratón de EA. Los experimentos utilizaron ratones transgénicos que expresaban la proteína precursora amiloide (APP) con la mutación Swedish humana bajo el control del promotor de cadena de PDGF-B. Con el tiempo, estos ratones generan altos niveles del ligando de RAGE, amiloide beta ($A\beta$). Previamente, se ha mostrado que el tratamiento con RAGEs durante 3 meses reduce tanto la formación de placa amiloide en el cerebro como el aumento asociado en marcadores inflamatorios en este modelo.

- Los ratones con APP (macho) usados en este experimento se diseñaron mediante microinyección del gen de APP humano (con las mutaciones Swedish y London) en ovocitos de ratón bajo el control del promotor del gen de cadena B de factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-B). Se generaron los ratones en un antecedente C57BL/6 y se desarrollaron por Molecular Therapeutics Inc. Se alimentaron los animales a voluntad y se mantuvieron mediante apareamiento hermano-hermana. Los ratones generados a partir de este constructo desarrollan depósitos de amiloide comenzando a los 6 meses de edad. Se criaron los animales durante 6 meses y entonces se mantuvieron durante 90 días y se sacrificaron para la cuantificación del amiloide.

- 25 Se les administró a ratones transgénicos para APP vehículo o TTP4000 cada dos días [qod (i.p.)] durante 90 días comenzando a los 6 meses de edad. Al final del experimento, se sacrificaron los animales y se examinaron para determinar la carga de placas de $A\beta$ en el cerebro (es decir, el número de placas). Se usó un grupo de APP control de 6 meses para determinar el nivel inicial de depósitos de amiloide. Además, al final del estudio, se sometieron los animales a análisis de comportamiento (laberinto de agua de Morris). Los investigadores eran ciegos para los compuestos de estudio. Se administraron las muestras a los ratones a 0,25 ml/ratón/cada dos días. Además, se le administraron a un grupo de ratones 200 ug/día de RAGEs humano.

1. Deposición de amiloide beta

- 35 Para el examen histológico, se anestesiaron los animales con una inyección intraperitoneal (i.p.) de pentobarbital sódico (50 mg/kg). Se perfundieron los animales de manera transcardial con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4°C seguido por paraformaldehído al 4%. Se extirparon los cerebros y se colocaron en paraformaldehído al 4% durante la noche. Se procesaron los cerebros con parafina y se incrustaron. Se obtuvieron diez secciones en serie de 30 μ m de grosor a través del cerebro. Se sometieron las secciones a anticuerpo primario durante la noche a 4°C (anticuerpo frente a péptido $A\beta$) con el fin de detectar los depósitos de amiloide en el cerebro de los animales transgénicos (Guo *et al.*, J. Neurosci., 22:5900-5909 (2002)). Se lavaron las secciones en solución salina tamponada con Tris (TBS) y se añadió anticuerpo secundario y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar, se incubaron las secciones tal como se instruye en el kit Vector ABC Elite (Vector Laboratories) y se tiñeron con ácido diaminobenzoico (DAB). Se detuvieron las reacciones en agua y se cubrieron con el cubreobjetos tras el tratamiento con xileno. Se determinó el área de amiloide en cada sección con un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador, que consiste en un ordenador Power Macintosh equipado con una tarjeta de captura de fotogramas Quick Capture, una cámara Hitachi CCD montada en un microscopio Olympus y un trípode de cámara. Se usó el software de análisis de imágenes de los NIH, v. 1.55. Se capturaron las imágenes y se determinó el área total de amiloide a lo largo de las diez secciones. Un operario ciego para el estado del tratamiento realizó todas las mediciones. Se realizó la suma de los volúmenes de amiloide de las secciones y la división entre el número total de secciones para calcular el volumen de amiloide.

- 55 Para el análisis cuantitativo, se usó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para medir los niveles $A\beta$ total humano, $A\beta_{total}$ y $A\beta_{1-42}$ en los cerebros de ratones transgénicos para APP (Biosource International, Camarillo, CA). Se extrajeron $A\beta_{total}$ y $A\beta_{1-42}$ de los cerebros de los ratones mediante clorhidrato de guanidina y se cuantificaron tal como describe el fabricante. Este ensayo extrae el péptido $A\beta$ total del cerebro (tanto soluble como agregado).

60 2. Función cognitiva

- Se realizaron pruebas en el laberinto de agua de Morris tal como sigue: Se sometieron a prueba todos los ratones una vez en la prueba de laberinto de agua de Morris al final del experimento. Se entrenaron los ratones en un laberinto de agua de campo abierto de 1,2 m. Se llenó la piscina hasta una profundidad de hasta una profundidad de 30 cm con agua y se mantuvo a 25°C. Se colocó la plataforma de escape (10 cm cuadrados) 1 cm por debajo de la

superficie del agua. Durante los ensayos, se retiró la plataforma de la piscina. Se llevó a cabo la prueba con indicios en la piscina rodeada de cortinas blancas para esconder cualquier indicio exterior al laberinto. Se sometieron todos los animales a entrenamiento previo no espacial (NSP) durante tres días consecutivos. Estos ensayos son para preparar a los animales para la prueba de comportamiento final para determinar la retención de memoria para encontrar la plataforma. Estos ensayos no se registraron, sino que eran para fines de entrenamiento sólo. Para los estudios de entrenamiento y aprendizaje, se retiraron las cortinas para visualizar indicios exteriores al laberinto (esto permitió la identificación de animales con alteraciones en la natación). En el día 1, se colocaron los ratones en la plataforma escondida durante 20 segundos (ensayo 1), para los ensayos 2-3 se liberaron los animales en el agua a una distancia de 10 cm de la plataforma con indicios o la plataforma escondida (ensayo 4) y se dejó que nadaran hasta la plataforma. En el segundo día de ensayos, se movió aleatoriamente la plataforma escondida entre el centro de la piscina o el centro de cada cuadrante. Se liberaron los animales en la piscina, orientados aleatoriamente hacia la pared y se les dejó 60 segundos para que alcanzaran la plataforma (3 ensayos). En el tercer ensayo, se les proporcionó a los animales tres ensayos, dos con una plataforma escondida y uno con una plataforma con indicios. Dos días tras el NSP, se sometieron los animales a ensayos de comportamiento finales (prueba de laberinto de agua de Morris). Para estos ensayos (3 por animal), se colocó la plataforma en el centro de un cuadrante de la piscina y se liberaron los animales orientados hacia la pared en un modo aleatorio. Se dejó que el animal encontrara la plataforma o nadara durante 60 segundos (periodo de latencia, el tiempo que tarda en encontrar la plataforma). Se sometieron a prueba todos los animales en el plazo de 4-6 horas de la dosificación y se seleccionaron aleatoriamente para las pruebas por un operario ciego para el grupo de prueba.

Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviaciones estándar (DE). Se analizó la significación de las diferencias en los estudios de amiloide y de comportamiento usando una prueba de la t. Se realizaron las comparaciones entre el grupo control de APP de 6 meses de edad y los animales tratados con TTP-4000, así como el grupo tratado con vehículo de APP de 9 meses de edad y los animales tratados con TTP-4000. Diferencias por debajo de 0,05 se consideraron significativas. Se determinaron los cambios en porcentaje en amiloide y comportamiento tomando la suma de los datos en cada grupo y dividiendo entre la comparación (es decir, 1, i.p./control de 6 meses = % de cambio).

Las figuras 14A y 14B muestran que ratones tratados durante 3 meses con o bien TTP-4000 o bien RAGEs de ratón tenían menos placas de A β y menos disfunción cognitiva que animales tratados con vehículo e IgG1 humana (IgG1) control negativo. Estos datos indican que TTP-4000 es eficaz en la reducción de la patología de EA en un modelo de ratón transgénico. También se encontró que, como RAGEs, TTP-4000 puede reducir las citocinas inflamatorias IL-1 y TNF- α (datos no mostrados).

C. Eficacia de TTP-4000 en un modelo animal de accidente cerebrovascular

También se comparó TTP-4000 con RAGEs en un modelo animal relevante para la enfermedad de accidente cerebrovascular. En este modelo, se ligó la arteria carótida media de un ratón durante 1 hora seguido por 23 horas de perfusión, momento en el que se sacrificaron los ratones y se evaluó el área del infarto en el cerebro. Se trataron los ratones con RAGEs o TTP-4000 o inmunoglobulina control justo antes de la perfusión.

En estos experimentos, se les inyectó a C57BL/6 macho vehículo a 250 μ l/ratón o artículos de prueba de TTP (TTP-3000, TTP-4000 a 250 μ l/ratón). Se les inyectó a los ratones por vía intraperitoneal, 1 hora tras el inicio de la isquemia. Se sometieron los ratones a una hora de isquemia cerebral seguido por 24 horas de perfusión. Para inducir la isquemia, se anestesió cada ratón y se mantuvo la temperatura corporal a 36-37°C mediante calentamiento externo. Se expuso la arteria carótida común izquierda (ACC) a través de una incisión en la línea media en el cuello. Se colocó una pinza microquirúrgica alrededor del origen de la arteria carótida interna (ACI). Se ligó el extremo distal de la ACE con seda y se transfirió. Se ató de manera floja una seda 6-0 alrededor del muñón de la ACE. Se insertó suavemente la punta pulida al fuego de una sutura de nailon en el muñón de la ACE. Se apretó el bucle de la seda 6-0 alrededor del muñón y se hizo avanzar la sutura de nailon al interior y a través de la arteria carótida interna (ACI), hasta que se apoyaba en la arteria cerebral anterior, ocluyendo de ese modo las arterias cerebrales media y de comunicación anterior. Tras haber estado la sutura de nailon en su lugar durante 1 hora, volvió a anestesiarse el animal, se registró la temperatura rectal y se retiró la sutura y se cerró la incisión.

Se determinó el volumen de infarto anestesiando los animales con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) y extirpando entonces los cerebros. Entonces se cortaron los cerebros en cuatro secciones de 2 mm a través de la región infartada y se colocaron en cloruro de trifeníltetrazolio (TTC) al 2% durante 30 minutos. Después, se colocaron las secciones en paraformaldehído al 4% durante la noche. Se determinó el área de infarto en cada sección con un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador, que consiste en un ordenador Power Macintosh equipado con una tarjeta de captura de fotogramas Quick Capture, una cámara Hitachi CCD montada sobre un trípode de cámara. Se usó el software de análisis de imágenes de los NIH, v. 1.55. Se capturaron las imágenes y se determinó el área de infarto total a lo largo de las secciones. Un único operario ciego para el estado del tratamiento realizó todas las mediciones. Sumando los volúmenes de infarto de las secciones se calculó el volumen de infarto total. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE). Se analizó la significación de la diferencia en los datos de volumen de infarto usando una prueba de la t.

Tal como se ilustra mediante los datos en la tabla 2, TTP-4000 era más eficaz que RAGEs en la limitación del área de infarto en estos animales, lo que sugiere que TTP-4000, debido a su mejor semivida en plasma, podía mantener una mayor protección en estos ratones.

5
Ejemplo 6: Detección de proteína de fusión de RAGE mediante ELISA
 Inicialmente, se recubren 50 ul del anticuerpo monoclonal específico frente a RAGE 1HB1011 a una concentración de 10 ug/ml en 1X PBS pH 7,3 sobre placas por medio de incubación durante la noche. Cuando están listas para su
 10 uso, se lavan las placas tres veces con 300 ul de tampón de lavado 1X imidazol-Tween y se bloquean con BSA al 1%. Se añaden las muestras (diluidas) y diluciones patrón de diluciones de TTP-4000 conocidas a un volumen final de 100 ul. Se permite que las muestras se incuben a temperatura ambiente durante una hora. Tras la incubación, se lavan las placas tres veces. Se añade un conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG1 humana (Sigma A3312)-AP en 1XPBS con BSA al 1% y se permite que se incube a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavan las placas
 15 tres veces. Se determina el color con fosfato de paranitrofenilo.

Ejemplo 7: Cuantificación de la unión de ligando de RAGE a proteína de fusión de RAGE

La figura 15 muestra las curvas de unión de saturación con TTP-4000 a diversos ligandos de RAGE conocidos
 20 inmovilizados. Los ligandos se inmovilizan sobre una placa de microtitulación y se incuban en presencia de concentraciones crecientes de proteína de fusión de desde 0 hasta 360 nM. Se detecta la interacción proteína de fusión-ligando usando un anticuerpo policlonal conjugado con fosfatasa alcalina que es específico para la porción de IgG de la quimera de fusión. Se calcularon las Kd relativas usando el software Graphpad Prism y coinciden con valores establecidos en la bibliografía de valores de RAGE-ligando de RAGE. HMG1B = anfoterina, CML= carboximetil-lisina, A beta = amiloide beta 1-40.
 25

Lista de secuencias

<110> TransTech Pharma, Inc.
 30 <120> Proteínas de fusión de RAGE y métodos de uso
 <130> 41305-318492
 <150> Documento US 60/598.555
 <151> 03-08-2004
 <160> 44
 35 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 1

ES 2 473 587 T3

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

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp

ES 2 473 587 T3

115		120		125											
Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Cys
130						135					140				
Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Ser	Trp	His	Leu	Asp
145					150					155					160
Gly	Lys	Pro	Leu	Val	Pro	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Lys	Glu	Gln
				165					170					175	
Thr	Arg	Arg	His	Pro	Glu	Thr	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu
			180					185					190		
Met	Val	Thr	Pro	Ala	Arg	Gly	Gly	Asp	Pro	Arg	Pro	Thr	Phe	Ser	Cys
		195					200					205			
Ser	Phe	Ser	Pro	Gly	Leu	Pro	Arg	His	Arg	Ala	Leu	Arg	Thr	Ala	Pro
210						215					220				
Ile	Gln	Pro	Arg	Val	Trp	Glu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Gln	Leu
225					230					235					240
Val	Val	Glu	Pro	Glu	Gly	Gly	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr
				245					250					255	
Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Pro	Ala	Gln	Pro	Ser	Pro	Gln	Ile	His	Trp	Met
			260					265					270		
Lys	Asp	Gly	Val	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Val	Leu	Ile	Leu
	275						280					285			
Pro	Glu	Ile	Gly	Pro	Gln	Asp	Gln	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Thr
290						295					300				
His	Ser	Ser	His	Gly	Pro	Gln	Glu	Ser	Arg	Ala	Val	Ser	Ile	Ser	Ile
305					310					315				320	

ES 2 473 587 T3

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
325 330 335

Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly
340 345 350

Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg
355 360 365

Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu
370 375 380

Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser
385 390 395 400

Thr Gly Gly Pro

<210> 2

<211> 382

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

ES 2 473 587 T3

Asn	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	85	90	95
Gln	Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	100	105	110
Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Cys	Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Tyr	115	120	125
Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Ser	Trp	His	Leu	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Val	Pro	130	135	140
Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Lys	Glu	Gln	Thr	Arg	Arg	His	Pro	Glu	145	150	155
Thr	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu	Met	Val	Thr	Pro	Ala	Arg	165	170	175
Gly	Gly	Asp	Pro	Arg	Pro	Thr	Phe	Ser	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	Gly	Leu	180	185	190
Pro	Arg	His	Arg	Ala	Leu	Arg	Thr	Ala	Pro	Ile	Gln	Pro	Arg	Val	Trp	195	200	205
Glu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Val	Glu	Pro	Glu	Gly	210	215	220
Gly	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Pro	225	230	235
Ala	Gln	Pro	Ser	Pro	Gln	Ile	His	Trp	Met	Lys	Asp	Gly	Val	Pro	Leu	245	250	255
Pro	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Val	Leu	Ile	Leu	Pro	Glu	Ile	Gly	Pro	Gln	260	265	270
Asp	Gln	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Thr	His	Ser	Ser	His	Gly	Pro	275	280	285

ES 2 473 587 T3

Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu
290 295 300

Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
305 310 315 320

Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Ile
325 330 335

Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys
340 345 350

Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln
355 360 365

Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
370 375 380

<210> 3

<211> 381

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

ES 2 473 587 T3

Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	Gln	85	90	95	
Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Ala	100	105	110	
Gly	Val	Pro	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Cys	Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro	115	120	125	
Ala	Gly	Thr	Leu	Ser	Trp	His	Leu	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Val	Pro	Asn	130	135	140	
Glu	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Lys	Glu	Gln	Thr	Arg	Arg	His	Pro	Glu	Thr	145	150	155	160
Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu	Met	Val	Thr	Pro	Ala	Arg	Gly	165	170	175	
Gly	Asp	Pro	Arg	Pro	Thr	Phe	Ser	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	Gly	Leu	Pro	180	185	190	
Arg	His	Arg	Ala	Leu	Arg	Thr	Ala	Pro	Ile	Gln	Pro	Arg	Val	Trp	Glu	195	200	205	
Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Val	Glu	Pro	Glu	Gly	Gly	210	215	220	
Ala	Val	Ala	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Pro	Ala	225	230	235	240
Gln	Pro	Ser	Pro	Gln	Ile	His	Trp	Met	Lys	Asp	Gly	Val	Pro	Leu	Pro	245	250	255	
Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Val	Leu	Ile	Leu	Pro	Glu	Ile	Gly	Pro	Gln	Asp	260	265	270	
Gln	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Thr	His	Ser	Ser	His	Gly	Pro	Gln	275	280	285	

ES 2 473 587 T3

Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly
290 295 300

Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu
305 310 315 320

Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly
325 330 335

Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala
340 345 350

Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser
355 360 365

Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
370 375 380

<210> 4

<211> 339

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

ES 2 473 587 T3

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
115 120 125

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

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
145 150 155 160

Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
165 170 175

Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
180 185 190

Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
210 215 220

Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
245 250 255

Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
260 265 270

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu

ES 2 473 587 T3

275

280

285

Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
290 295 300

His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
305 310 315 320

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
325 330 335

Gly Leu Gly

<210> 5

<211> 317

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr

ES 2 473 587 T3

100	105	110
Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr		
115	120	125
Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro		
130	135	140
Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu		
145	150	155
Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg		
165	170	175
Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu		
180	185	190
Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp		
195	200	205
Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly		
210	215	220
Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro		
225	230	235
Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu		
245	250	255
Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln		
260	265	270
Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro		
275	280	285
Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu		
290	295	300
Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly		
305	310	315

<210> 6

<211> 316

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

ES 2 473 587 T3

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

ES 2 473 587 T3

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala
225 230 235 240

Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro
245 250 255

Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp
260 265 270

Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln
275 280 285

Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly
290 295 300

Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly
305 310 315

<210> 7

<211> 94

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

ES 2 473 587 T3

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg
85 90

<210> 8

<211> 93

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg
85 90

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys
20 25 30

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

ES 2 473 587 T3

<400> 10

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys
20 25

<210> 11

<211> 98

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn
1 5 10 15

Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu
20 25 30

Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val
35 40 45

Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr
50 55 60
Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg
65 70 75 80

Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala
85 90 95

Leu Arg

10

<210> 12

<211> 91

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

ES 2 473 587 T3

Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val
1 5 10 15

Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
20 25 30

Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp
35 40 45

Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu
50 55 60

Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser
65 70 75 80

Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser
85 90

<210> 13

<211> 101

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys
100

<210> 14

<211> 100

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

ES 2 473 587 T3

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60
Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys
100

<210> 15

<211> 114

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

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

Ala Gly
<210> 16

ES 2 473 587 T3

<211> 113

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

5 Gly

<210> 17

<211> 204

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 17

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

ES 2 473 587 T3

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

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

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
195 200

<210> 18

<211> 203

<212> PRT

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln

5

195 200

<210> 19

<211> 229

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 19

ES 2 473 587 T3

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

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

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

ES 2 473 587 T3

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

ES 2 473 587 T3

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro
225

<210> 20

<211> 228

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

ES 2 473 587 T3

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro

225

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys

1

5

<210> 22

<211> 30

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu

1

5

10

15

Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro

20

25

30

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

15

ES 2 473 587 T3

	Val	Tyr	Gln	Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu
	1				5					10						15

	Leu	Thr	Ala	Gly
				20

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

5

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Thr Ala Pro Ile Gln

1

5

<210> 25

<211> 354

<212> ADN

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

	atggcagccg	gaacagcagt	tggagcctgg	gtgctggtcc	tcagtctgtg	gggggcagta	60
	gtaggtgctc	aaaacatcac	agcccggatt	ggcgagccac	tggtgctgaa	gtgtaagggg	120
	gcccccaaga	aaccacccca	gcggtctggaa	tggaaactga	acacaggccg	gacagaagct	180
	tggaaggtcc	tgtctcccca	gggaggaggg	ccctgggaca	gtgtggctcg	tgtccttccc	240
	aacggctccc	tcttccttcc	ggctgtcggg	atccaggatg	aggggatttt	ccggtgccag	300
	gcaatgaaca	ggaatggaaa	ggagaccaag	tccaactacc	gagtccgtgt	ctac	354

<210> 26

<211> 369

<212> ADN

15

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

	atggcagccg	gaacagcagt	tggagcctgg	gtgctggtcc	tcagtctgtg	gggggcagta	60
	gtaggtgctc	aaaacatcac	agcccggatt	ggcgagccac	tggtgctgaa	gtgtaagggg	120
	gcccccaaga	aaccacccca	gcggtctggaa	tggaaactga	acacaggccg	gacagaagct	180
	tggaaggtcc	tgtctcccca	gggaggaggg	ccctgggaca	gtgtggctcg	tgtccttccc	240
	aacggctccc	tcttccttcc	ggctgtcggg	atccaggatg	aggggatttt	ccggtgccag	300
	gcaatgaaca	ggaatggaaa	ggagaccaag	tccaactacc	gagtccgtgt	ctaccagatt	360

cctgggaag

<210> 27

<211> 408

<212> ADN

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

25

<400> 27

ES 2 473 587 T3

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tgggaaggctc tgtctcccca gggaggaggg ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggt 408

<210> 28

<211> 690

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tgggaaggctc tgtctcccca gggaggaggg ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tcccaataag 420
 gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttgat 480
 gggaagcccc tggcgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac 540
 cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgacccagc ccggggagga 600
 gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc tccccgaca ccgggccttg 660
 cgcacagccc ccatccagcc ccgtgtcttg 690

<210> 29

<211> 753

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

ES 2 473 587 T3

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta	60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg	120
gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct	180
tgggaaggctc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgccttccc	240
aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt	360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tcccaataag	420
gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat	480
gggaagcccc tggcgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac	540
cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgacccagc ccggggagga	600
gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc tccccgaca ccgggccttg	660
cgcacagccc ccatccagcc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg	720
gtggtggagc cagaagggtg agcagtagct cct	753

<210> 30

<211> 1386

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Homo sapiens*

<400> 30

ES 2 473 587 T3

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctggtec tcagtctgtg gggggcagta	60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tgggtgctgaa gtgtaagggg	120
gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct	180
tggaagggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc	240
aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt	360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctgggtgt tcccaataag	420
gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttgat	480
gggaagcccc tgggtgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac	540
cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgacccagc ccggggagga	600
gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttccccgaca ccgggccttg	660
cgcacagccc ccatccagcc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg	720
gtggtggagc cagaagggtg agcagtagct cctccgtcag tcttcctctt cccccaaaa	780
cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgagggtca catgcgtggg ggtggacgtg	840
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	900
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggg cagcgtctc	960
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa	1020
gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca	1080
cagggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc	1140
tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1200
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc	1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1320
gtgatgcattg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	1380
aatga	1386

<210> 31

<211> 1041

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Homo sapiens*

<400> 31

ES 2 473 587 T3

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta	60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg	120
gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct	180
tgggaaggctc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc	240
aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt	360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtcc gtcagtcttc	420
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	480
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	540
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	600
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	660
aaggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	720
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	780
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	840
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	900
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	960
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1020
tcctgtctc cgggtaaattg a	1041

<210> 32

<211> 461

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Homo sapiens*

<400> 32

ES 2 473 587 T3

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

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp

ES 2 473 587 T3

115		120		125
Ser Ala Ser Glu Leu Thr	Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys			
130	135	140		
Val Ser Glu Gly Ser Tyr	Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp			
145	150	155	160	
Gly Lys Pro Leu Val	Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln			
165	170	175		
Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu				
180	185	190		
Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys				
195	200	205		
Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro				
210	215	220		
Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu				
225	230	235	240	
Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu				
245	250	255		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu				
260	265	270		
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys				
275	280	285		
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys				
290	295	300		
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu				
305	310	315	320	

ES 2 473 587 T3

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

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

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

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 33

<211> 439

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Homo sapiens*

<400> 33

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn

ES 2 473 587 T3

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

ES 2 473 587 T3

Gly Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 34

<211> 438

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 34

ES 2 473 587 T3

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

ES 2 473 587 T3

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
225 230 235 240

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
245 250 255

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
260 265 270

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
275 280 285

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
290 295 300

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
305 310 315 320

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
325 330 335

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
340 345 350

ES 2 473 587 T3

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
355 360 365

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
370 375 380

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
385 390 395 400

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
405 410 415

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
420 425 430

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 35

<211> 346

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Homo sapiens*

<400> 35

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

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

ES 2 473 587 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
275 280 285

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

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
325 330 335

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345

<210> 36

<211> 324

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Homo sapiens*

<400> 36

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

ES 2 473 587 T3

Ser	Pro	Gln	Gly	Gly	Gly	Pro	Trp	Asp	Ser	Val	Ala	Arg	Val	Leu	Pro	65	70	75	80
Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	Ala	Val	Gly	Ile	Gln	Asp	Glu	Gly	Ile	85	90	95	
Phe	Arg	Cys	Gln	Ala	Met	Asn	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	100	105	110	
Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	Gln	Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp	115	120	125	
Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	130	135	140	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	145	150	155	160
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	165	170	175	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	180	185	190	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	195	200	205	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	210	215	220	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	225	230	235	240
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	245	250	255	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	260	265	270	

ES 2 473 587 T3

Asn	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	
				85					90					95		
Gln	Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	
			100					105					110			
Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
			115				120					125				
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
	130					135					140					
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
145					150				155						160	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
				165					170					175		
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
			180					185					190			
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
		195					200					205				
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
	210					215					220					
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
225					230					235					240	
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
				245					250					255		
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
			260					265					270			
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
		275					280					285				

ES 2 473 587 T3

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
290 295 300

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 37

<211> 323

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Homo sapiens*

<400> 37

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

ES 2 473 587 T3

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
115 120 125

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
130 135 140

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
145 150 155 160

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
165 170 175

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
195 200 205

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
210 215 220

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
225 230 235 240

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
245 250 255

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
260 265 270

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
275 280 285

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
290 295 300

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
305 310 315 320

Pro Gly Lys

<210> 38

<211> 210

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

ES 2 473 587 T3

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
1 5 10 15

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
20 25 30

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
35 40 45

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
50 55 60

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
65 70 75 80

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
85 90 95

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
100 105 110

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
115 120 125

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
130 135 140

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
145 150 155 160

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
165 170 175

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
180 185 190

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
195 200 205

Gly Lys

210

<210> 39

<211> 633

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

ES 2 473 587 T3

```

ccgtcagtct tctctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt . 60
gaggtcacat gcgtgggtggg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 120
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 180
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 240
gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 300
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 360
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 420
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 480
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 540
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 600
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 633

```

<210> 40

<211> 220

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

ES 2 473 587 T3

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
115 120 125

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
195 200 205

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 41

<211> 663

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

ES 2 473 587 T3

ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tectcttccc cccaaaaccc 60
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 120
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 180
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc 240
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaagggtct caacaaagcc 300
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 360
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc 420
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 480
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 540
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 600
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 660
tga 663

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

ES 2 473 587 T3

<400> 43

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 44

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
20 25

5

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión que comprende un polipéptido de RAGE unido directamente a un polipéptido distinto de RAGE,
5 en la que el polipéptido distinto de RAGE comprende (i) un dominio C_H2 de una inmunoglobulina, o una porción de un dominio C_H2 de una inmunoglobulina que puede plegarse, y (ii) un dominio C_H3 de una inmunoglobulina;
en la que el polipéptido de RAGE comprende un sitio de unión a ligando de RAGE;
- 10 en la que el polipéptido de RAGE comprende un ligador interdominio de RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina de RAGE de manera que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido N-terminal del ligador interdominio de RAGE, y el aminoácido C-terminal del ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal del polipéptido distinto de RAGE; y
- 15 en la que la proteína de fusión comprende un ligador interdominio derivado de RAGE en vez de un polipéptido bisagra interdominio derivado de una inmunoglobulina.
2. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende (a) el ligador interdominio de RAGE que separa los dominios V y C1 de RAGE o (b) el ligador interdominio de RAGE que separa los dominios C1 y C2 de RAGE, en lugar de la región bisagra de la cadena pesada de inmunoglobulina.
- 20 3. Proteína de fusión según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el polipéptido de RAGE comprende un fragmento de RAGEs humano, en la que la secuencia de RAGEs humano se expone en SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.
- 25 4. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína de fusión comprende un primer dominio de inmunoglobulina de RAGE y un primer ligador interdominio de RAGE unido a un segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE y un segundo ligador interdominio de RAGE, de manera que el aminoácido N-terminal del primer ligador interdominio de RAGE está unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de inmunoglobulina de RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE está unido al aminoácido C-terminal del primer ligador interdominio de RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo ligador interdominio de RAGE está unido al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina de RAGE y el aminoácido C-terminal del segundo ligador interdominio de RAGE está unido directamente al aminoácido N-terminal del dominio C_H2 de la inmunoglobulina o la porción del dominio C_H2 de la inmunoglobulina del polipéptido distinto de RAGE.
- 30 5. Proteína de fusión según la reivindicación 4, en la que el segundo ligador interdominio de RAGE comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 o una secuencia idéntica al menos en un 90% a la misma, o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 24 o una secuencia idéntica al menos en un 90% a la misma.
- 40 6. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que el polipéptido de RAGE es un único dominio de inmunoglobulina de RAGE unido por medio de un ligador interdominio de RAGE al aminoácido N-terminal del polipéptido distinto de RAGE.
- 45 7. Proteína de fusión según la reivindicación 6, en la que el ligador interdominio de RAGE comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 o una secuencia idéntica al menos en un 90% a la misma, o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 23 o una secuencia idéntica al menos en un 90% a la misma.
- 50 8. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el sitio de unión a ligando de RAGE comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia idéntica al menos en un 90% a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia idéntica al menos en un 90% a la misma.
- 55 9. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que el polipéptido de RAGE comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20 o una secuencia idéntica al menos en un 90% a las mismas.
- 60 10. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de RAGE se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.
11. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido distinto de RAGE es o comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 38.
- 65 12. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana seleccionada del grupo que consiste en: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

13. Proteína de fusión según la reivindicación 12, en la que la inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
14. Proteína de fusión según la reivindicación 13, en la que la inmunoglobulina es IgG1.
15. Proteína de fusión según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37.
16. Proteína de fusión según la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 37.
17. Proteína de fusión según la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 34.
18. Proteína de fusión según la reivindicación 1, que puede codificarse por la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 30.
19. Proteína de fusión según la reivindicación 1, que puede codificarse por la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 31.
20. Ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
21. Ácido nucleico según la reivindicación 20, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de RAGE es o comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en una cualquiera de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29.
22. Ácido nucleico según la reivindicación 20, que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31.
23. Vector de expresión que codifica para una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y/o que comprende un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 20-22.
24. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en un portador farmacéutico.
25. Composición farmacéutica según la reivindicación 24, formulada como o bien una disolución inyectable o bien un polvo liofilizado estéril.
26. Método *in vitro* de preparación de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 que comprende la etapa de unir covalentemente el polipéptido de RAGE al polipéptido distinto de RAGE.
27. Método según la reivindicación 26, en el que la proteína de fusión puede obtenerse eliminando la región bisagra F_C de la inmunoglobulina y reemplazándola por el polipéptido de RAGE.
28. Método según la reivindicación 26, en el que la proteína de fusión está codificada por un constructo de ADN recombinante.
29. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, que comprende además la etapa de incorporar el constructo de ADN en un vector de expresión.
30. Método según la reivindicación 29, que comprende además transfectar el vector de expresión en una célula huésped.
31. Uso de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por RAGE en un sujeto.
32. Uso según la reivindicación 31, en el que el medicamento está destinado para administración intravenosa, intraperitoneal o subcutánea de la proteína de fusión de RAGE al sujeto.
33. Uso según la reivindicación 31 o 32, en el que el medicamento está destinado a tratar un síntoma de diabetes o un síntoma de complicaciones diabéticas tardías.
34. Uso según la reivindicación 33, en el que el síntoma de diabetes o complicaciones diabéticas tardías comprende nefropatía diabética, retinopatía diabética, una úlcera de pie diabético, una complicación cardiovascular o neuropatía diabética.
35. Uso según la reivindicación 31 ó 32, en el que el medicamento está destinado a tratar amiloidosis; enfermedad de Alzheimer; cáncer; insuficiencia renal; o inflamación asociada con cualquiera de autoinmunidad, enfermedad

inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, hipoxia, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, choque hemorrágico, septicemia, trasplante de órgano o cicatrización de heridas alterada.

- 5 36. Célula huésped aislada que comprende un vector de expresión según la reivindicación 23.
37. Célula huésped según la reivindicación 36, en la que la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino.
38. Método de producción de una proteína de fusión que comprende cultivar una célula huésped según la reivindicación 36 ó 37.

FIG. 1A**RAGE HUMANO (SEQ ID NO:1)**

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGGLGT LALALGILGG
 LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
 TGGP

RAGE HUMANO SIN SECUENCIA SEÑAL (SEQ ID NO: 2)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGGLGT LALALGILGG
 LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
 TGGP

FIG. 1B**RAGE HUMANO SIN SECUENCIA SEÑAL (SEQ ID NO: 3)**

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGGLGT LALALGILGG
 LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
 TGGP

FIG. 1C**RAGEs HUMANO - (SEQ ID NO: 4)**

```

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTILTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

```

RAGEs HUMANO SIN SECUENCIA SEÑAL (SEQ ID NO: 5)

```

                                AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTILTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

```

RAGEs HUMANO SIN SECUENCIA SEÑAL (SEQ ID NO: 6)

```

                                QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTILTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

```

FIG. 1D

DOMINIO V DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 7)

_AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

DOMINIO V DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 8)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

FRAGMENTO DE DOMINIO V DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO:9)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

FRAGMENTO DE DOMINIO V DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO:10)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

AMINOÁCIDOS 124-221 DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 11)

PEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL R

AMINOÁCIDOS 227-317 DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 12)

PRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTILTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVS

AMINOÁCIDOS 23-123 DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 13)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGK

FIG. 1 E

AMINOÁCIDOS 24-123 DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 14)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGK

AMINOÁCIDOS 23-136 DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 15)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

AMINOÁCIDOS 24-136 DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 16)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

AMINOÁCIDOS 23-226 DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 17)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQ

AMINOÁCIDOS 24-226 DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 18)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQ

FIG. 1F

AMINOÁCIDOS 23-251 DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 19)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

AMINOÁCIDOS 24-251 DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 20)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

LIGADOR DE RAGE (SEQ ID NO: 21)

VYQIPGK

LIGADOR DE RAGE (SEQ ID NO: 22)

TAPIQPRVWE PVPLEEVQLV VEPEGGAVAP

LIGADOR DE RAGE (SEQ ID NO: 23)

VYQIPGKPEI VDSASELTAG

LIGADOR DE RAGE (SEQ ID NO: 24)

TAPIQ

FIG. 1G**ADN QUE CODIFICA PARA RAGE HUMANO 1-118 (SEQ ID NO: 25)**

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 CTAC

ADN QUE CODIFICA PARA RAGE HUMANO 1-123 (SEQ ID NO: 26)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 CTACCAGATT CCTGGGAAG

ADN QUE CODIFICA PARA RAGE HUMANO 1-136 (SEQ ID NO: 27)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
 CGGCTGGT

FIG. 1H**ADN QUE CODIFICA PARA RAGE HUMANO 1-230 (SEQ ID NO: 28)**

```

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG GTTCCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG

```

ADN QUE CODIFICA PARA RAGE HUMANO 1-251 (SEQ ID NO: 29)

```

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG GTTCCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
CCT

```

FIG. 1I**DOMINIOS C_H2 Y C_H3 HUMANOS PARCIALES (SEQ ID NO: 38)**

```

PSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP
IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
LHNHYTQKSL SLSPGK

```

ADN QUE CODIFICA PARA LOS DOMINIOS C_H2 Y C_H3 HUMANOS PARCIALES (SEQ ID NO: 39)

```

CCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC
TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

```

DOMINIOS C_H2 Y C_H3 HUMANOS (SEQ ID NO: 40)

```

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLT LVKGFPYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

FIG. 1J

ADN QUE CODIFICA PARA LOS DOMINIOS C_H2 Y C_H3 HUMANOS (SEQ ID NO: 41)

```

CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
CCCAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC AACAAGACCAC
GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA
CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
TCCGGGTAAA TGA

```

DOMINIO C_H2 HUMANO (SEQ ID NO: 42)

```

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
LPAPIEKTIS KAK

```

DOMINIO C_H3 HUMANO (SEQ ID NO: 43)

```

GQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

LIGADOR DE RAGE (SEQ ID NO: 44)

```

ISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LA

```

```

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAGCTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGGAAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
CCTCCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT
CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC
TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

```

Secuencia de ADN de la región que codifica para RAGE-Fc (TTP-4000)
(SEQ ID NO: 30)

FIG. 2

```

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GCGGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCCCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAAC TACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTCC GTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC
ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA
CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC
ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA
GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA
CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG
CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG A

```

Secuencia de ADN de la región que codifica para RAGE-Fc (TTP-3000)
(SEQ ID NO: 31)

FIG. 3

SEQ ID NO: 32

MAAGTAVGAW ALVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQORLE
 WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI
 SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ
 PENNYKTPPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY
 TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 33

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQORLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 34

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQORLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

Secuencias alternativas que codifican para una proteína de fusión de Fc de IgG-RAGE
 de cuatro dominios

FIG. 4

SEQ ID NO: 35

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQORLE
 WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL
 MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 36

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQORLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 37

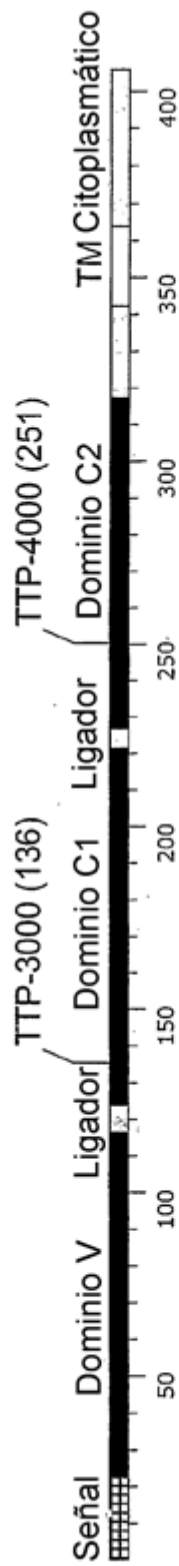
QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQORLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

Secuencias alternativas que codifican para una proteína de fusión de Fc de IgG-RAGE
 de tres dominios

FIG. 5

FIG. 6A

Estructura de dominios de RAGEh



Fc de Ig gamma-1 HUMANA

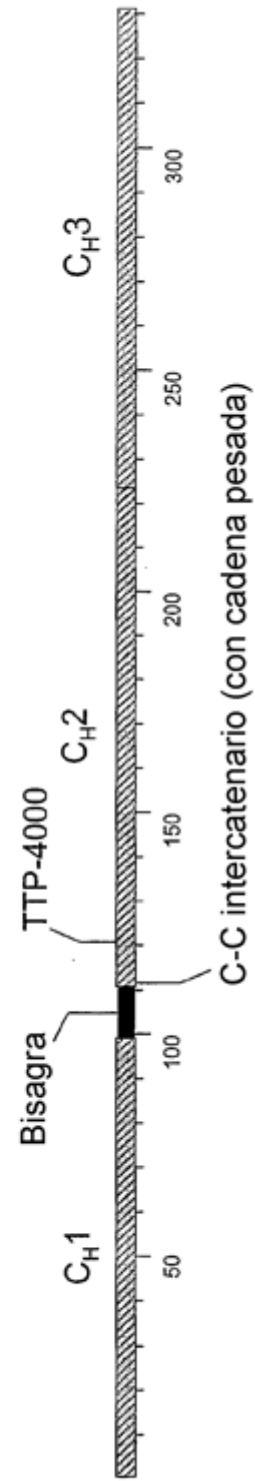


FIG. 6B

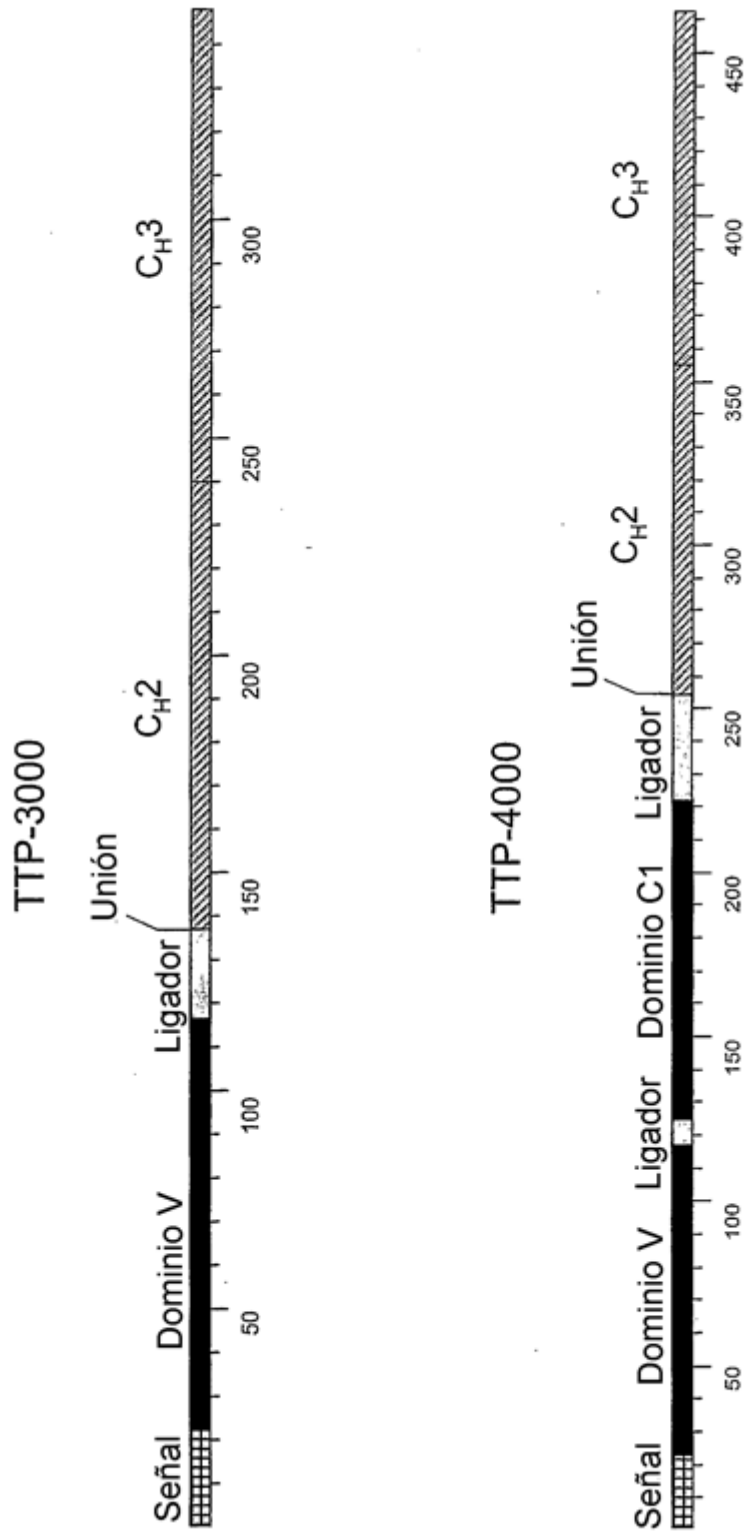


FIG. 7

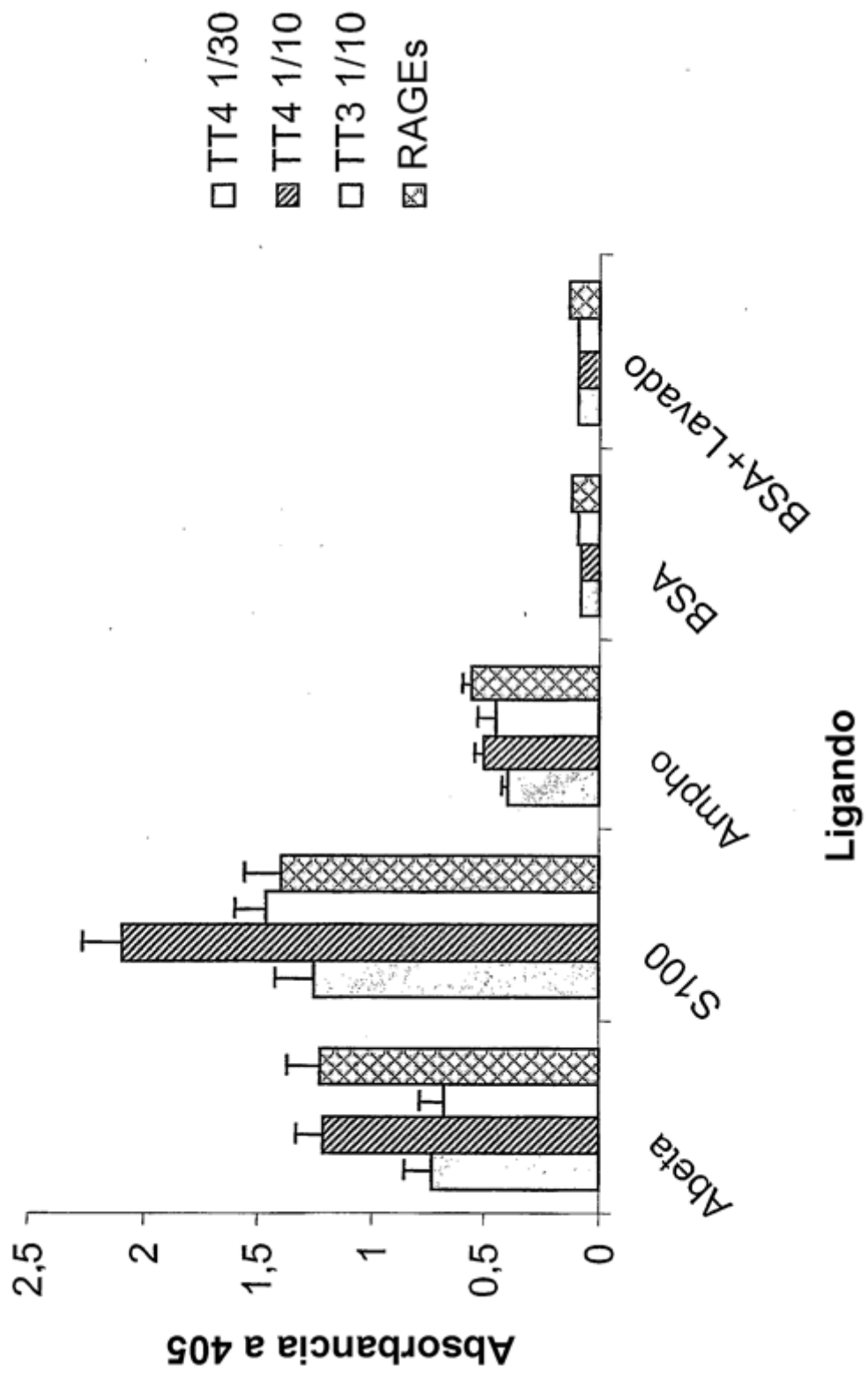


FIG. 8

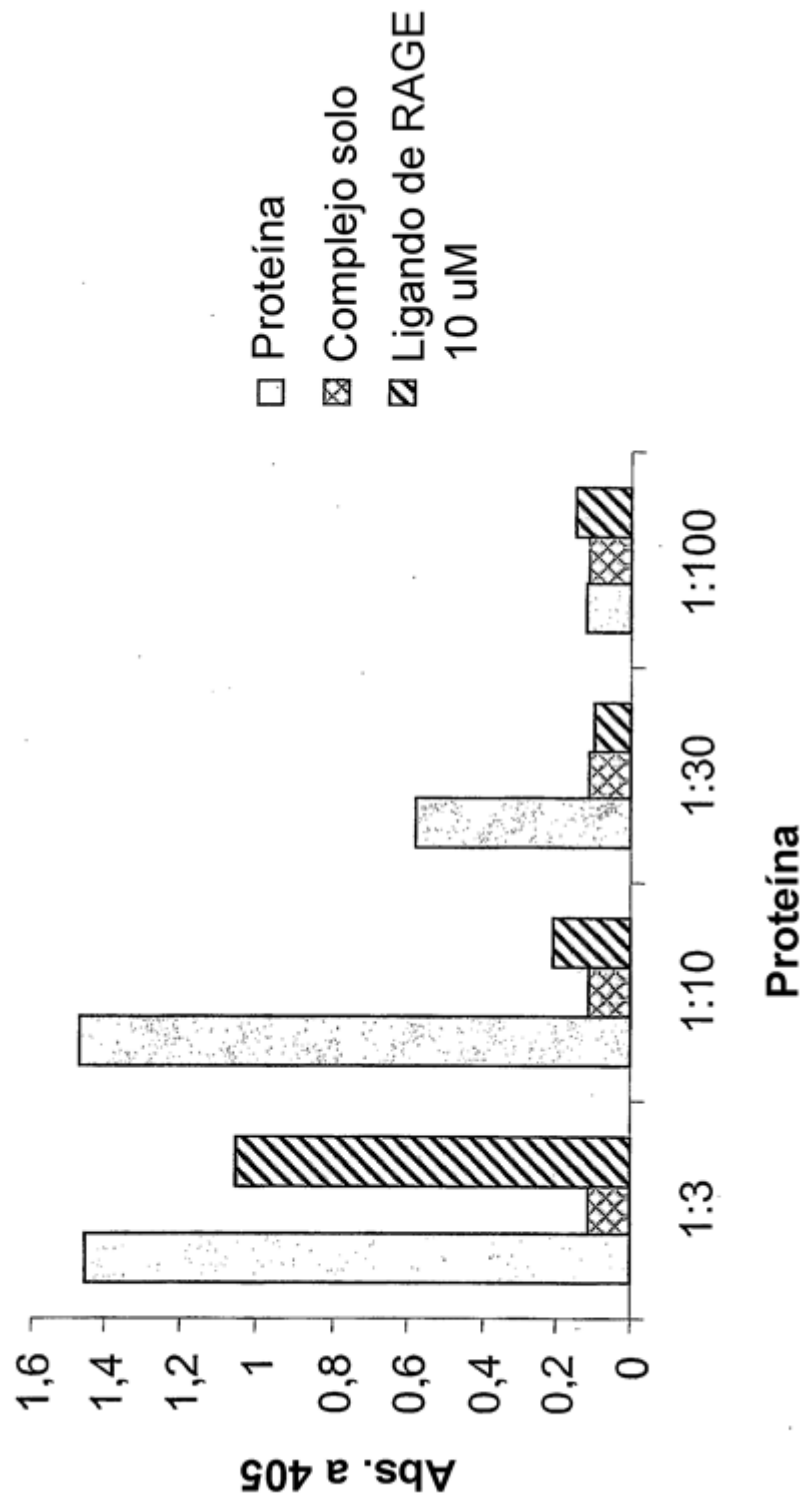


FIG. 9

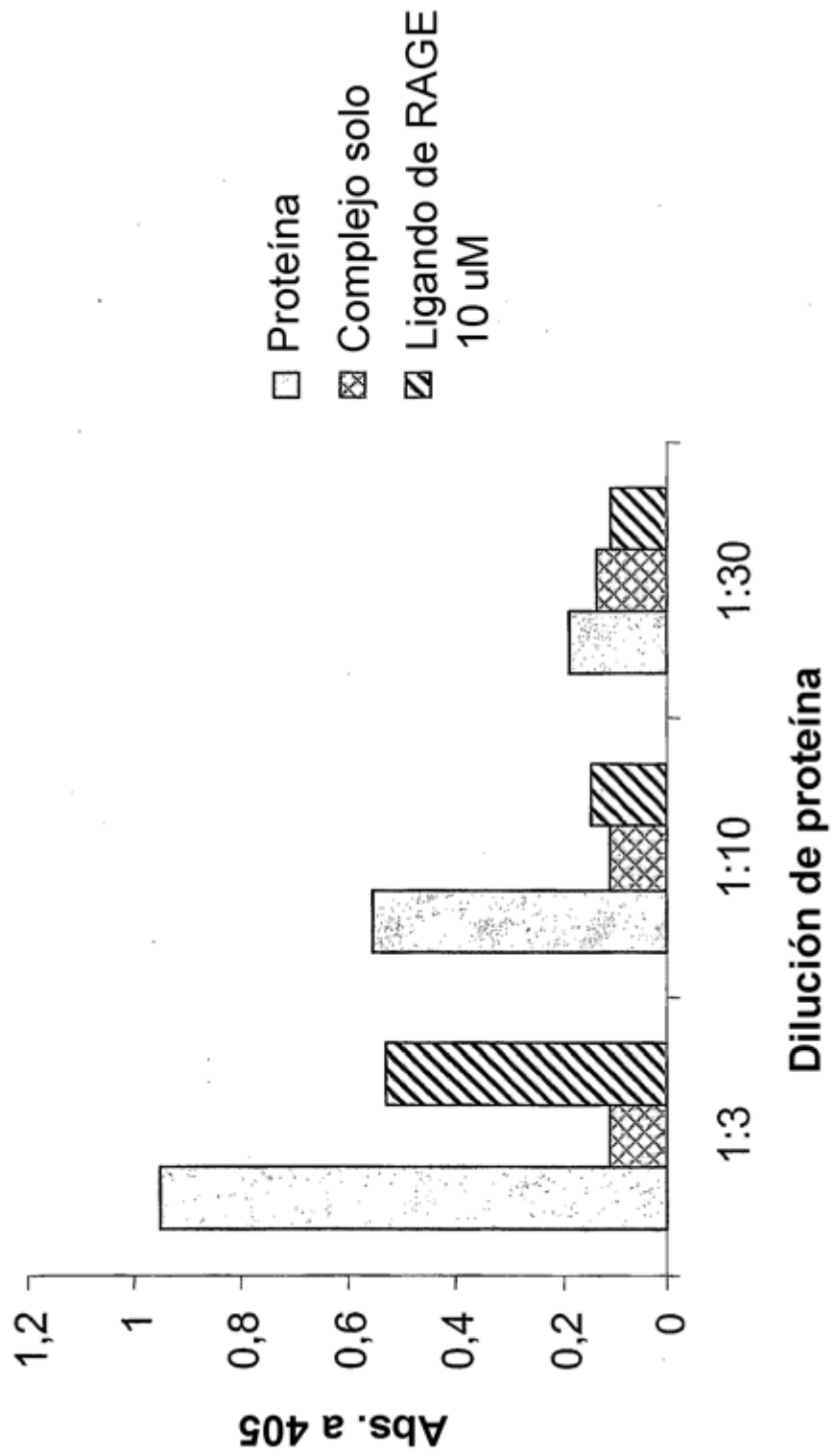


FIG. 10

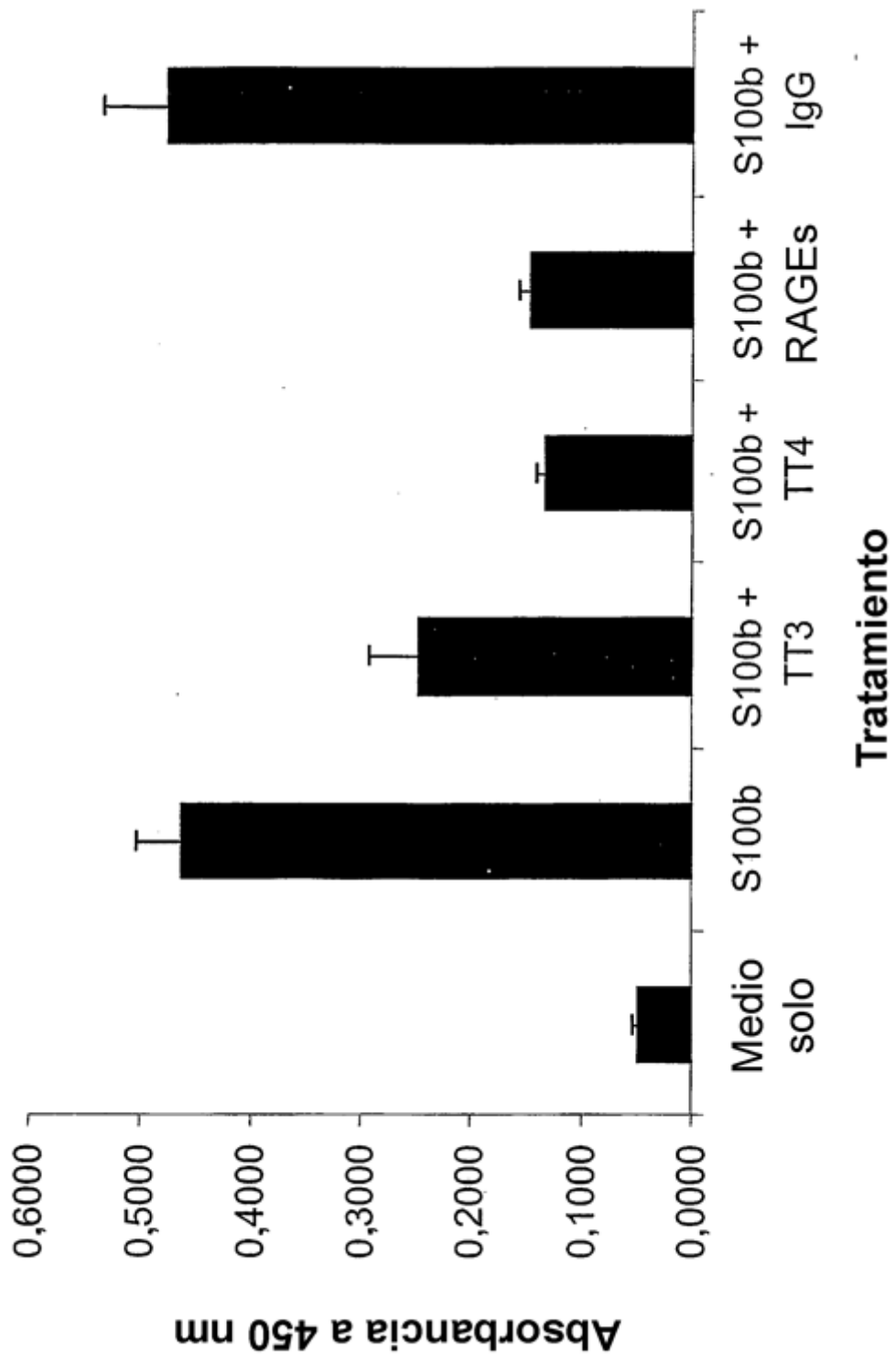


FIG. 11

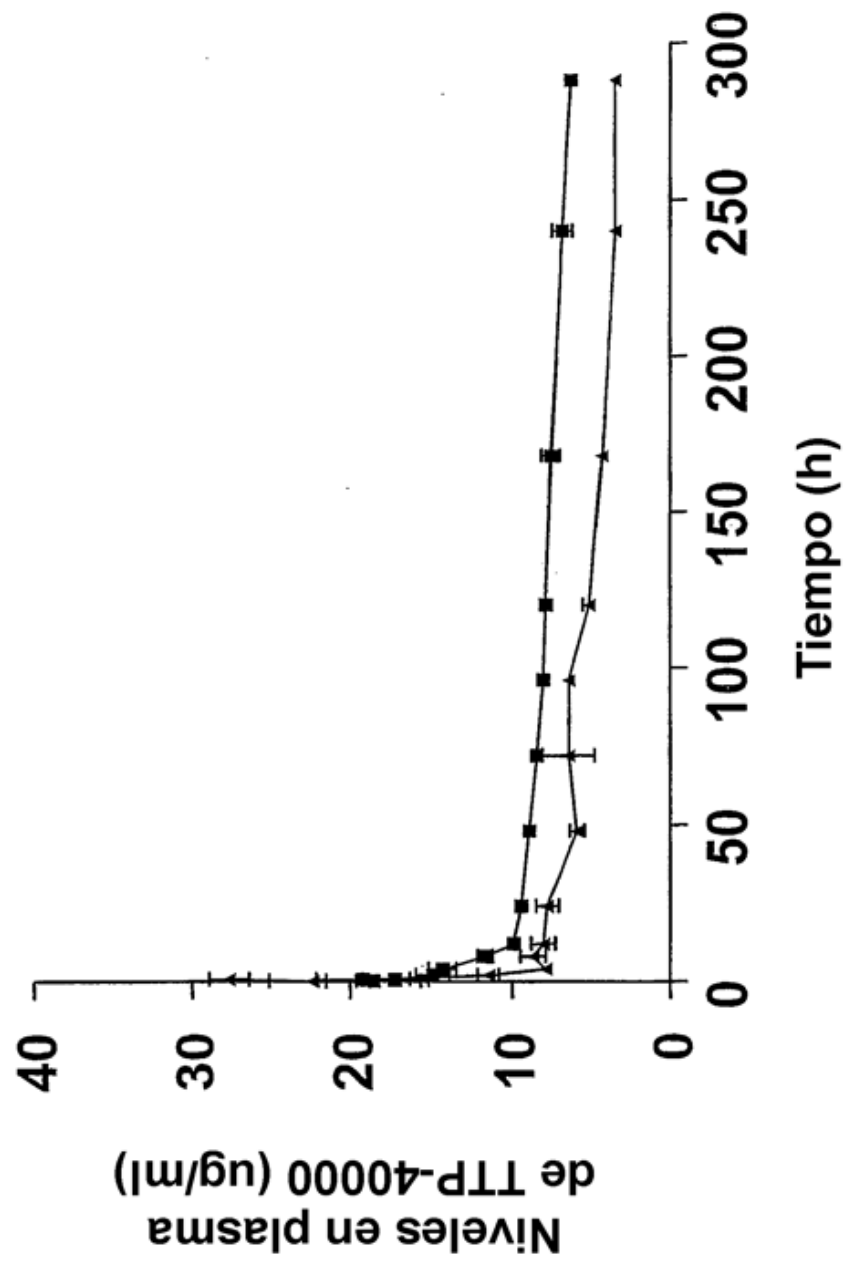


FIG. 12

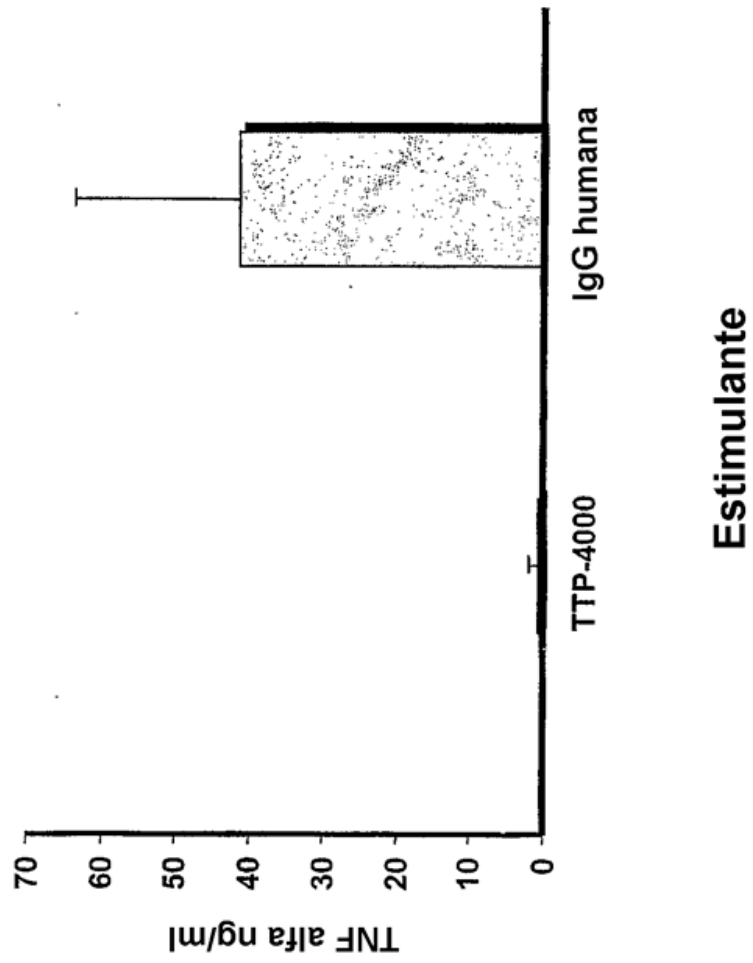


FIG. 13A

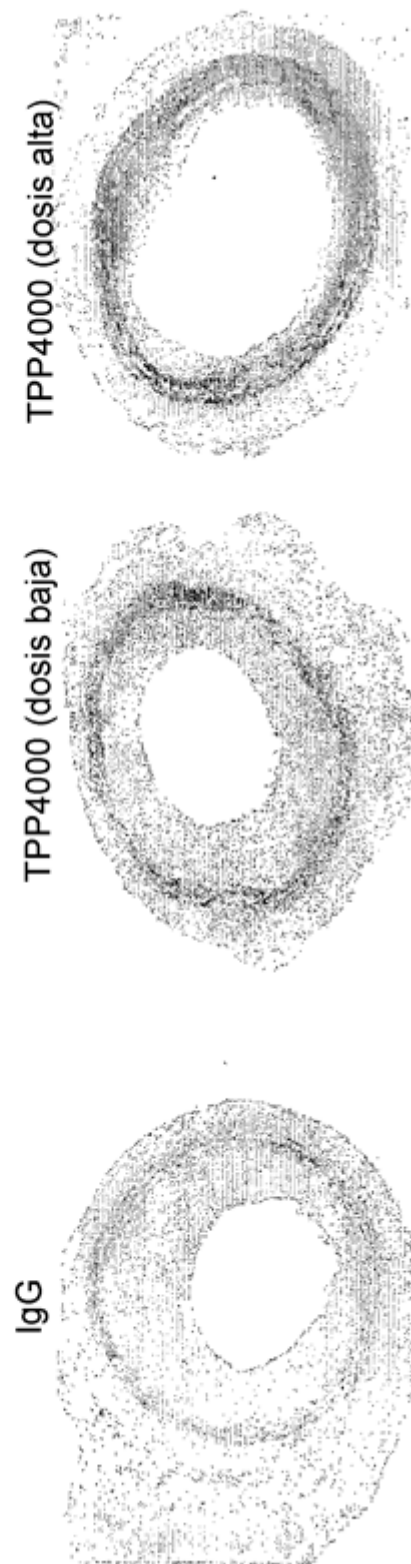


FIG. 13B

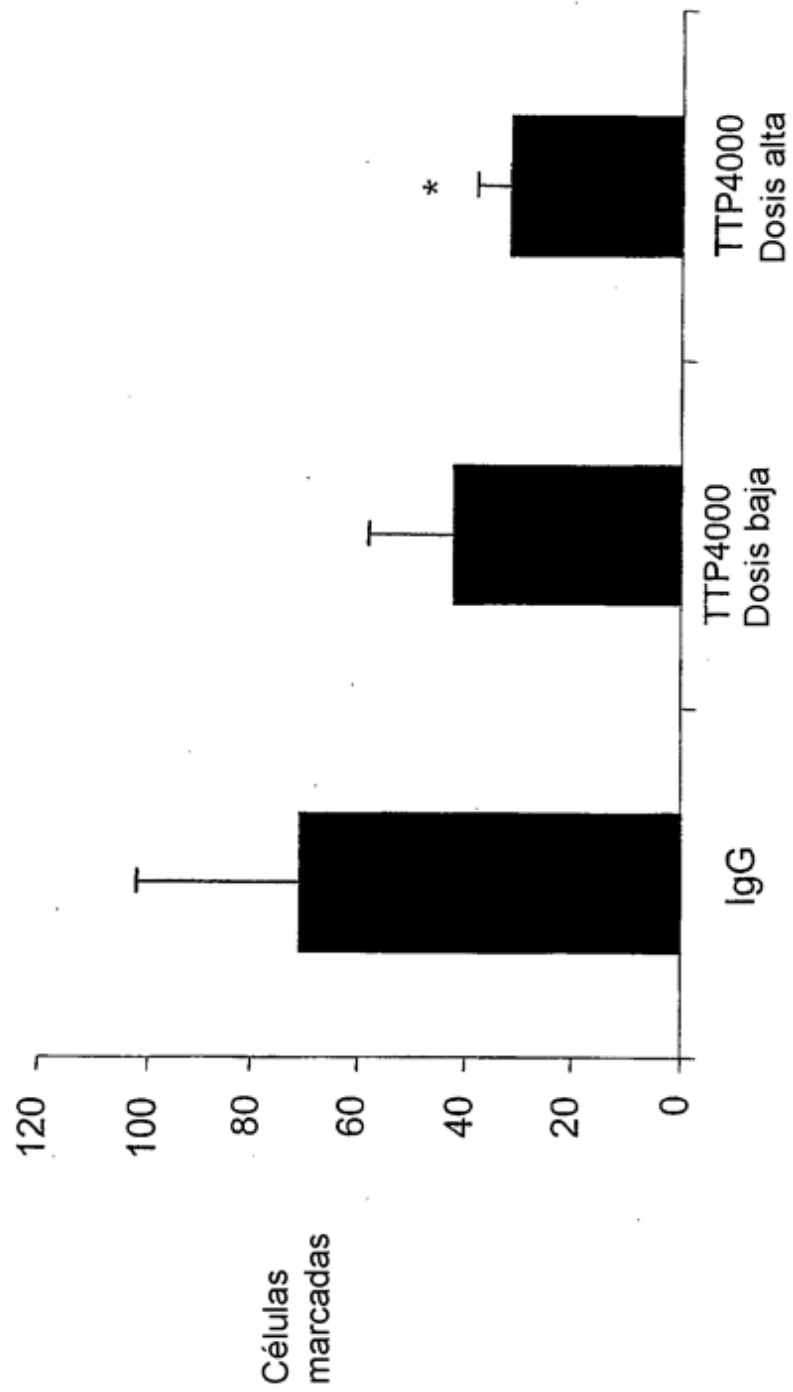


FIG. 14A

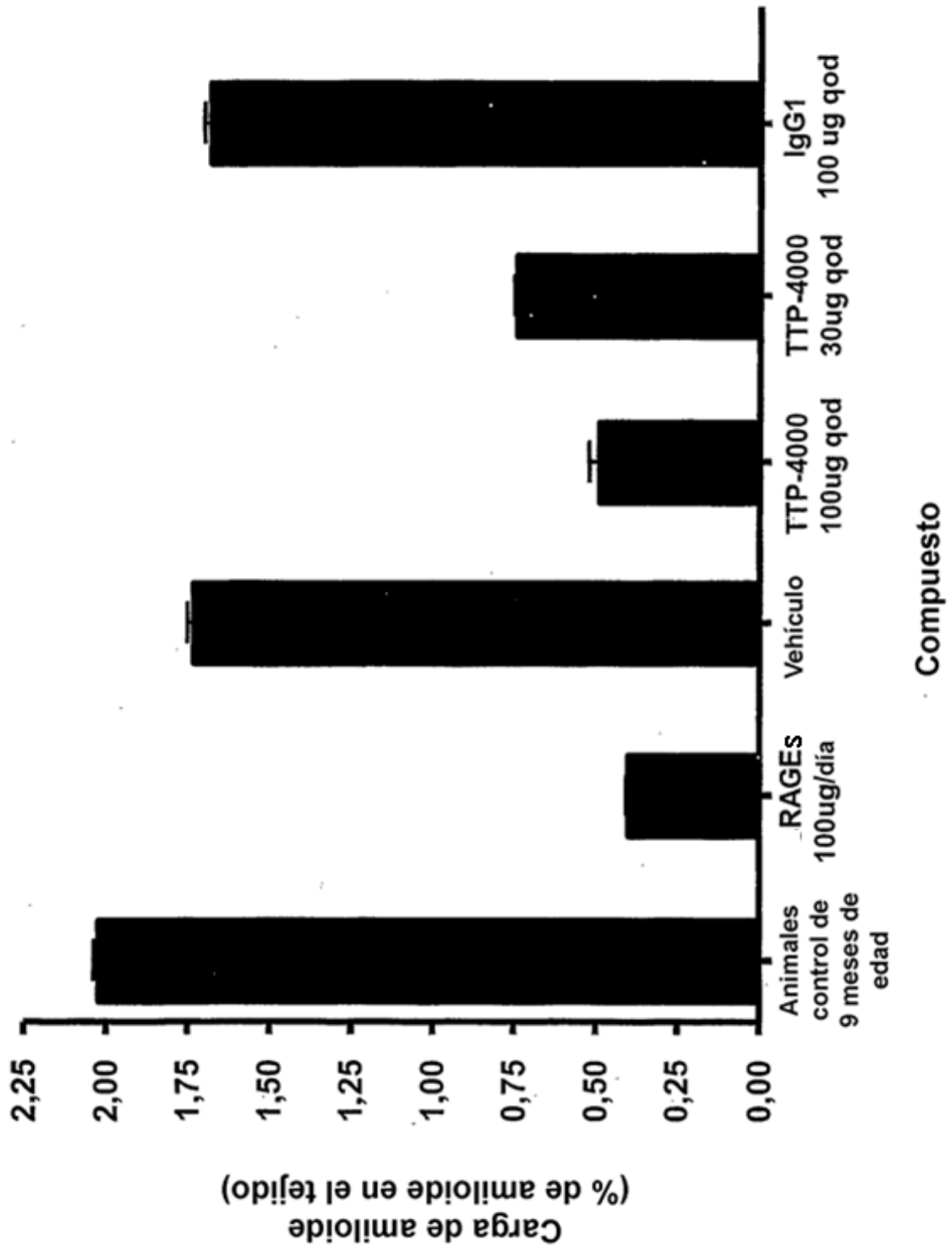


FIG. 14B

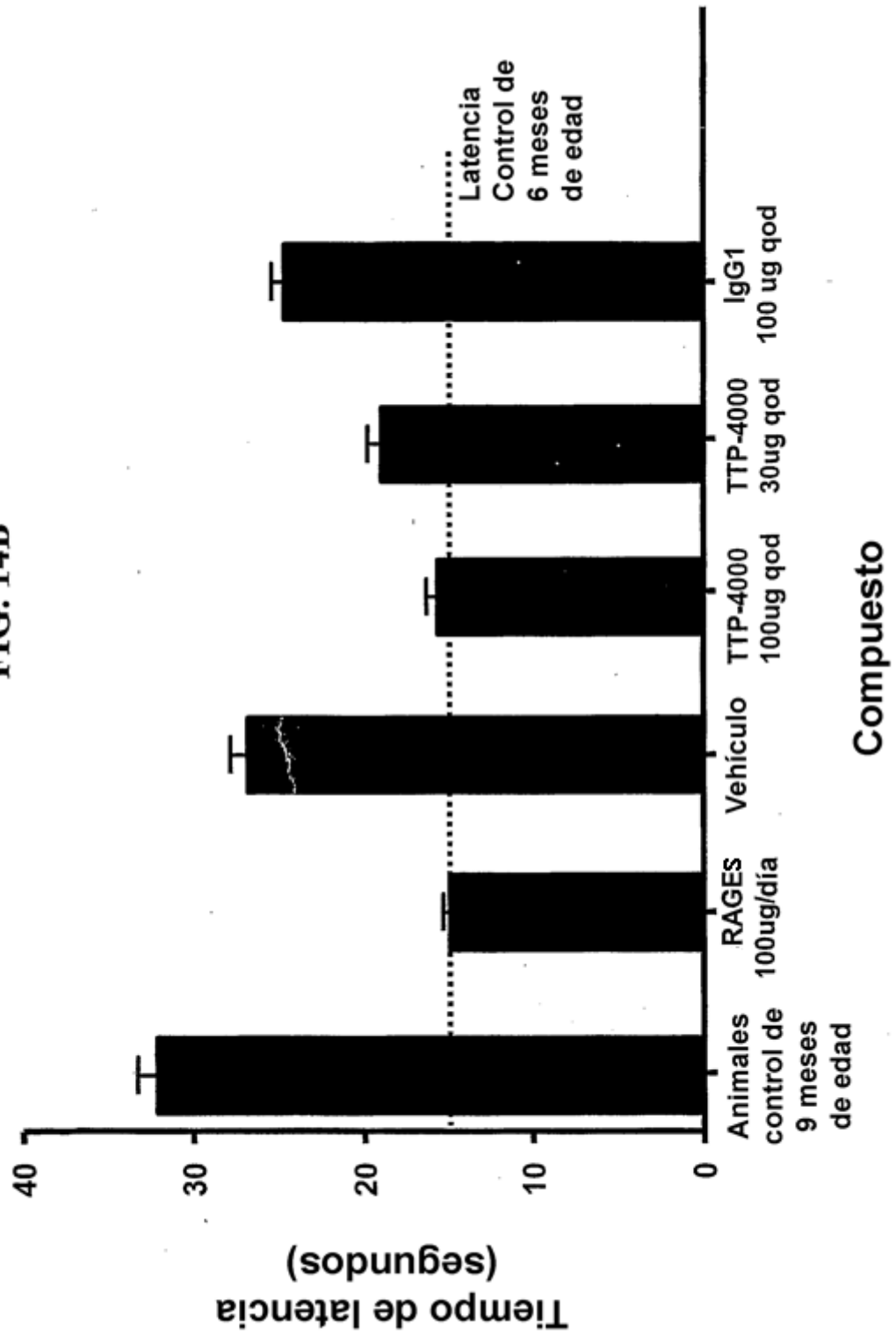


FIG. 15

