

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 486 673**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2010 E 10714095 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2408468**

(54) Título: **Uso de NKp46 para prevenir la diabetes tipo I**

(30) Prioridad:

**19.03.2009 US 202629
09.11.2009 US 259340**

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

19.08.2014

(73) Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
LTD. (33.3%)
Hi-Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat
Ram, P.O.B 39135
91390 Jerusalem, IL;
HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND
DEVELOPMENT LTD. (33.3%) y
BEN-GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV
RESEARCH AND DEVELOPMENT AUTHORITY
(33.3%)**

(72) Inventor/es:

**MANDELBOIM, OFER;
PORGAJOR, ANGEL;
NAPARSTEK, YAAKOV y
GUR, CHAMUTAL**

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 486 673 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).

Uso de NKp46 para prevenir la diabetes tipo I**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La invención se refiere al uso del receptor de citotoxicidad natural NKp46 para prevenir y tratar la diabetes, incluyendo la diabetes tipo I (DT1) y la diabetes tipo 2. En particular, la invención presenta composiciones que comprenden un fragmento de la región extracelular de NKp46 para prevenir la aparición y progresión de la diabetes.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] La diabetes tipo 1 (DT1; también conocida como diabetes mellitas tipo 1 y diabetes inmunomedida) es una enfermedad autoinmune multifactorial en la que las células beta productoras de insulina en los islotes pancreáticos son destruidas por células T autorreactivas. Las células mononucleares se infiltran en los islotes pancreáticos de Langerhans durante un periodo variable de inflamación clínicamente silenciosa (insulitis), y finalmente las células T destruyen las células beta productoras de insulina. La diabetes tipo 1 completa se produce cuando se destruyen la mayoría de células beta y el páncreas deja de producir suficiente insulina. La insulina exógena debe entonces administrarse de por vida. Semanas o meses después de que comience el tratamiento de insulina, los pacientes con diabetes tipo 1 pueden experimentar un periodo variable de remisión, que se cree que da lugar a la producción restaurada de insulina por las células beta residuales. Es necesario un tratamiento continuado con insulina exógena para preservar las células beta residuales, que todavía son capaces de modular de forma natural el metabolismo de la glucosa.

[0003] La diabetes tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina que puede combinarse con la secreción reducida de insulina. Se cree que la reactividad defectuosa a la insulina implica al receptor de insulina. En la etapa temprana de la diabetes tipo 2, la hiperglucemia puede retroceder mediante diversas medidas y medicaciones que mejoran la sensibilidad a la insulina o reducen la producción de glucosa por el hígado. A medida que la enfermedad progresiva, se produce el deterioro de la secreción de insulina, y se requiere a menudo un reemplazo terapéutico de insulina. La destrucción de las células beta se produce también en la diabetes tipo 2, y se ha propuesto que un factor contribuyente se aumente en la apoptosis de las células beta (Rhodes Science 2005 Jan 21; 307(5708): 380 - 4).

[0004] Un modelo ampliamente utilizado de DT1 autoinmune es el ratón diabético no obeso (NOD), que desarrolla espontáneamente la diabetes después de un periodo variable de insulitis, de manera similar a la DT1 humana. Los ratones NOD muestran insulitis a partir de 4 – 5 semanas de edad, y después de un periodo variable de inflamación crónica, la diabetes se desarrolla aproximadamente a las 10 – 20 semanas, con la mayoría de las hembras diabéticas a las 30 semanas (1,2). Un modelo aceptado adicional de diabetes autoinmune experimental en ratones es la inducción de diabetes mediante múltiples inyecciones de bajas dosis de estreptozotocina (LDST) (3,4). La estreptozotocina causa la diabetes por la citotoxicidad directa de las células beta, así como por la iniciación de la reacción autoinmune mediada celular contra las células beta (4,5). La transferencia adoptiva de los esplenocitos activados de los ratones tratados con LDST ha sido revelada para inducir la diabetes en ratones sanos sin tratamiento alguno (5).

[0005] Se considera que la TD1 es una enfermedad mediada por las células T. Sin embargo, varios estudios sugieren que el sistema inmune innato, en particular las células asesinas naturales (NK), desempeñan un papel en la patogénesis de la enfermedad. Por ejemplo, se ha revelado que las células NK se infiltran en los islotes de los ratones NOD (7), y se ha informado que la inflamación del islete fue mediada principalmente por las células NK en TD1 humana (8). Han sido reveladas diversas alteraciones en los comportamientos de las células NK en pacientes con DT1, tanto en el inicio de la enfermedad como después de la hiperglucemia a largo plazo (9). Además, se demostró el papel esencial de las células NK en el desarrollo de la diabetes en modelos murinos con DT1 acelerada (10,11). Poirot et al., 2004 revelaron que la proporción y el número de células NK, y el momento de su entrada en el páncreas se correlacionan con la gravedad de la DT1 en ratones NOD transgénicos (10). Asimismo se ha revelado que la deplección de células NK en modelos de ratones NOD transgénicos con DT1 acelerada inhibe de manera significativa el desarrollo de la diabetes (10,11). Sin embargo, los mecanismos moleculares de la implicación de las células NK en la DT1 son aún desconocidos.

[0006] Las células NK desempeñan un papel crucial en la defensa inicial contra las células infectadas por virus y las células cancerígenas (12). Interactúan con células presentadoras de antígeno (CPAs), sirven como CPAs para asesinar directamente a las células peligrosas y además secretan a las quimiocinas y a las citocinas inmunomoduladoras como IFN – γ e IFN – α, causando que las células T se cambien a un fenotipo Th1 (13, 14).

[0007] Las células NK reconocen células diana a través de una diversidad de receptores activadores y un equilibrio delicado entre las señales inhibitorias y activadoras que regulan fuertemente su activación (15 – 17). Las células NK se han identificado en órganos diana de pacientes que padecen enfermedades autoinmunes (18) y son capaces de atacar a las células autólogas (19 – 21).

- [0008]** La destrucción mediada por las células NK implica varios receptores de activación, como los receptores de citotoxicidad natural (NCRs) NKp30, NKp44, NKp46, y NKG2D. NKp30, NKp44 y NKp46 expresados casi exclusivamente en las células NK, mientras que NKG2D se expresa en tipos adicionales de linfocitos como las células T CD8⁺ (22). Se considera que NKp46 es el marcador NK más específico en el que se ha descubierto una proteína ortóloga (RCN- 1) en ratones (23, 24).
- [0009]** Pessino et al., 1998 revelan la clonación molecular de NKp46 y su papel en la citotoxicidad mediada (Pessino et al., J Exp Med 1998; 188: 953 – 960).
- [0010]** Algunos de los inventores de la presente invención han revelado que las proteínas de fusión (Ig) de inmunoglobulina NKp46 y NKp44, pero no una proteína de fusión (Ig) NKp30, se unen específicamente a la hemaglutinina del virus de la gripe y a la hemaglutinina – neuraminidasa del virus Sendai (29, 45, 46). Según estas divulgaciones, esta interacción es funcional y puede mediar una mayor destrucción de células infectadas. Además, la destrucción mejorada puede ser abolida por anticuerpos que bloquean la HA o los receptores NKp46 y NKp44.
- [0011]** El receptor NKp46 humano tiene múltiples isoformas incluyendo la isoforma a (número de acceso GenBank CAA04714); isoforma b (número de acceso GenBank CAA06872); isoforma c (número de acceso GenBank CAA06873), e isoforma d (número de acceso GenBank CAA06874). En general, el receptor NKp46 comprende dos dominios similares a la Ig extracelular del tipo C2, una parte de transmembrana y un segmento intracelular. La parte extracelular de NKp46 comprende un dominio D1 designado NKp46D1 (correspondiente a los residuos 22 – 120 de la proteína completa madura de la isoforma a), y un dominio D2 designado NKp46D2 que comprende 134 residuos de aminoácidos (correspondientes a los residuos 121 – 254 de la proteína completa de la isoforma a).
- [0012]** La publicación de la solicitud PCT Nº WO 02 / 08287 de algunos de los presentes inventores revela un complejo diana que comprende un segmento de reconocimiento diana que comprende NKp30, NKp44 y NKp46 o un fragmento funcional de los mismos; y un segmento activo que comprende una sustancia activa como un resto citotóxico, un resto de imagen o un fragmento de Ig. Según la divulgación, las proteínas de fusión que contienen los dominios extracelulares NKp30, NKp44 o NKp46 fusionados a la parte Fc de la IgG1 humana (denominado respectivamente NKp30 – Ig, NKp44 – Ig y NKp46 – Ig), se unen a varias dianas de células tumorales, y NKp46 – Ig se une a las células infectadas por virus. Se reveló además que son proteínas de fusión que contienen D1 o D2 fusionado a la parte Fc de la IgG1 humana (denominado respectivamente NKp46D1 – Ig y NKp46D2 – Ig), y se observó que D2 es responsable de la interacción con la hemaglutinina viral.
- [0013]** La publicación de solicitud PCT Nº WO 2004 / 053054 de algunos de los presentes inventores revela que un conjugado de NKp30 – Ig es eficaz en la inducción de la regresión del tumor *in vivo* en ratones desnudos portadores de cáncer. Además, se reveló que son composiciones farmacéuticas que comprenden un primer segmento seleccionado de NKp30, NKp44 y NKp46 o un fragmento funcional de los mismos, y un segundo segmento seleccionado de una molécula de Ig o un fragmento o un fragmento Fc de los mismos para eliminar un tumor o inhibir el crecimiento de un tumor.
- [0014]** La publicación de solicitud PCT Nº WO 2005 / 000086 de algunos de los presentes inventores revela fragmentos de péptido aislado que comprenden residuos glicosilados derivados de NKp44 y NKp46 que comprenden epítopos esenciales para la unión a las células diana. Según la divulgación, un péptido conector en el dominio D2 de NKp46 designado NKp46LP, correspondiente a los residuos 215 – 254 de la proteína completa, contiene un residuo de treonina O – glicosilada que es esencial para la unión de NKp46 a células infectadas por virus y a células tumorales. Se reveló además que es un péptido conector derivado del dominio extracelular de NKp44 correspondiente a los residuos 136 – 190 de la proteína completa y comprende una región hiperglicosilada que comprende al menos 14 sitios de glicosilación predichos que contribuyen a la unión eficaz a las células infectadas por virus. Se reveló además que son fragmentos peptídicos aislados de 10 – 100 aminoácidos derivados de los péptidos mencionados anteriormente que retienen la actividad biológica de interés.
- [0015]** La publicación de solicitud PCT Nº WO 2005 / 051973 de algunos de los presentes inventores revela péptidos derivados de NKp46, NKp44 y NKp30 que comprenden polisacáridos sulfatados y son capaces de unirse a las células tumorales. Se revelan específicamente péptidos derivados de NKp46 que corresponden a los residuos 153 – 172 y 153 – 175 de la proteína completa; péptidos derivados de NKp30 correspondientes a los residuos 57 – 84 y 57 – 76 de la proteína completa, y un péptido derivado de NKp44 correspondiente a los residuos 51 – 74 de la proteína completa.
- [0016]** La publicación de solicitud de patente EE.UU. Nº 2008 / 0274047 revela métodos de tratamiento inmunoproliferativo y trastornos autoinmunes que utilizan anticuerpos que se unen a los receptores celulares NK, en particular para reducir las células implicadas en la patología inmunoproliferativa. Según la divulgación, los trastornos inmunoproliferativos que pueden ser tratados por la invención incluyen la diabetes tipo 1, y el anticuerpo puede dirigirse contra NKp46 humano. Se reveló además que la inyección de anticuerpos NKp46 antihumano en ratones transgénicos que expresan NKp46 humano dio como resultado la depleción de células NK en sangre, bazo, hígado y pulmón.

5 [0017] La publicación de solicitud de patente EE.UU. Nº 2007 / 0231813 revela métodos y composiciones para evaluar la respuesta terapéutica de un sujeto en una composición terapéutica que comprende una parte Fc, preferiblemente un anticuerpo terapéutico, en el que el anticuerpo terapéutico preferiblemente no es capaz de, o no necesita ser capaz de, reducir las células diana. Según la divulgación, la composición puede unirse específicamente a un receptor NK *inter alia* NKp46 y el sujeto puede tener diabetes de inicio juvenil.

10 10 [0018] La publicación de solicitud de patente EE.UU. Nº 2004 / 0038339 revela un polipéptido multifuncional que comprende (a) un primer dominio que comprende un sitio de unión que reconoce específicamente un epítopo extracelular del complejo receptor NKG2D; y (b) un segundo dominio que tiene una función receptora o de unión, en el que dicha función receptora o de unión puede ser un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo o un fragmento del mismo dirigido contra *inter alia* NKp46 que interactúa con la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Según la divulgación, la composición puede ser utilizada para tratar enfermedades autoinmunes, *inter alia* diabetes mellitus insulinodependiente, en la que se desea la eliminación de la subpoblación de células inmunes que causa la enfermedad.

15 15 [0019] La publicación de solicitud PCT Nº WO 02 / 072631 revela un constructo molecular MHC que comprende una molécula portadora que tiene unido al mismo una o más moléculas MHC, y comprende además de manera opcional una o más moléculas biológicamente activas *inter alia* NKp46. Según la divulgación, el constructo puede ser utilizado para pronosticar o diagnosticar una enfermedad, o determinar la eficacia de un medicamento contra una enfermedad, y la enfermedad puede ser diabetes tipo 1.

20 20 [0020] La publicación de solicitud PCT Nº WO 2009 / 148568 revela una composición celular que comprende al menos el 30 % de células facilitadoras humanas (CFhs) que tienen un fenotipo de CD8⁺ / alfa beta TCR⁻ / delta gamma TCR⁻ / CD56^{dim} / neg, y en las que las CFhs tienen además un fenotipo que incluye NKp46⁺. Según la divulgación, la composición puede utilizarse para el trasplante en un sujeto humano que tiene una enfermedad *inter alias* diabetes.

25 30 [0021] Ogasawara et al. ("NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice"; Immunity, Vol. 20; Junio 2004, pág. 757 - 767), demuestran que la diabetes tipo 1 puede prevenirse bloqueando la función del receptor de células NK NKG2D en el modelo de ratones NOD con diabetes tipo 1. El bloqueo de NKG2D se consiguió mediante la administración de un anticuerpo monoclonal anti - NKG2D sin deplecionar. Se sugirió el uso de agentes que bloquean el receptor NKG2D como agentes terapéuticos. Sin embargo, Ogasawara et al. obvian indicar o sugerir los anticuerpos anti - NKp46.

35 35 [0022] Sigue existiendo una necesidad no cubierta para métodos terapéuticos dirigidos a la prevención e inhibición de la insulitis y la posterior aparición de la diabetes tipo 1. La técnica anterior no enseña o sugiere la utilización de NKp46, un fragmento aislado de NKp46 o una proteína de fusión que comprende un fragmento de NKp46 para suprimir el desarrollo de la diabetes tipo 1.

40 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0023] La presente invención presenta métodos para prevenir y tratar la diabetes tipo 1.

45 45 [0024] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que el receptor NKp46 humano y su ortólogo murino NCR – 1 reconocen específicamente tanto las células beta pancreáticas humanas como murinas, y que las células NK se degranulan tras la interacción con células beta murinas en una forma dependiente de NKp46. Los presentes inventores han demostrado sorprendentemente, tanto en ratones Knockout NKp46 como en el modelo LDST, que el desarrollo de la diabetes afecta a la ausencia de NKp46 y que el porcentaje más alto de células NK en el páncreas se observa en el momento en el que la insulitis se desarrolla en diabetes (etapa "prediabética"). Además, por primera vez se revela en la presente que la inyección de las proteínas de fusión NKp46 en ratones NOD hembra, ya sea en la etapa temprana de insulitis o en la etapa tardía, etapa prediabética, casi en su totalidad previene el desarrollo de diabetes. Los resultados experimentales en los que se basa la presente invención se revelan en Gur et al., 2010, escrito por algunos de los inventores de la presente invención, y publicado después de la fecha de prioridad de la presente solicitud (Gur et al., The NKp46 activating receptor is essential for diabetes development. Nat Immunol. 2010 Feb; 11(2): 121 - 8).

50 55 [0025] Sin desear estar ligado por cualquier teoría o mecanismo de acción particular, la eficacia de los métodos de la invención puede derivarse de la actividad de los anticuerpos anti - NKp46 que son células NK sin deplecionar, aunque más bien causan una disminución sistémica de NKp46, dando lugar a la disfunción de células NK y a la interrupción de la vía patológica que da lugar a la diabetes. Los anticuerpos anti - NKp46 pueden ser aquellos que se indujeron *in vivo* tras la administración de NKp46 o anticuerpos anti - NKp46 fabricados administrados pasivamente.

60 65 [0026] En un primer aspecto, la invención presenta una composición que comprende al menos una proteína y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que la proteína es seleccionada del grupo formado por: una proteína que comprende un fragmento aislado de la región extracelular de NKp46; un anticuerpo específico para la región

extracelular de NKp46, y una combinación de los mismos, para uso en la prevención o tratamiento de la diabetes tipo 1.

- 5 [0027] La proteína puede ser una proteína que comprende un fragmento aislado de la región extracelular de NKp46.
- [0028] El NKp46 puede ser NKp46 humano, preferiblemente el NKp46 humano es una isoforma seleccionada del grupo formado por la isoforma a, isoforma b, isoforma c e isoforma d.
- 10 [0029] El fragmento aislado de la región extracelular de NKp46 puede comprender el dominio D2 o un fragmento del mismo.
- [0030] Preferiblemente el fragmento aislado está sustancialmente desprovisto del dominio D1; o el fragmento aislado comprende el dominio D2 o un fragmento del mismo, y un fragmento del dominio D1; o el dominio D2 es seleccionado del grupo formado por SEC ID Nº 1; SEC ID Nº 2; SEC ID Nº 3; SEC ID Nº 4; SEC ID Nº 9 y SEC ID Nº 10; o el fragmento aislado comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo formado por SECs ID Nº 1 – 10; o el fragmento aislado comprende una variante del dominio D2, en el que la variante comprende al menos una sustitución aminoácida en el dominio D2, preferiblemente en la que al menos una sustitución de aminoácidos está en un residuo seleccionado del grupo formado por treonina 125, treonina 225, lisina 157, lisina 170, arginina 160, arginina 166, histidina 163, asparagina 216, y una combinación de los mismos, donde los números corresponden a las posiciones residuales de la SEC ID Nº 29, más preferiblemente donde la sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo formado por T125; T252A; T225S; T225N; N216A; K157Q; R160Q; H163Q; R166Q; K170T y una combinación de los mismos, donde los números corresponden a las posiciones residuales de NKp46 de la SEC ID Nº 29; o preferiblemente donde la variante del dominio D2 es seleccionada del grupo formado por las SECs ID Nº 12 – 16.
- [0031] La proteína que comprende un fragmento aislado de la región extracelular de NKp46 puede seleccionarse del grupo formado por una proteína de fusión y un conjugado proteico. Preferiblemente, la proteína de fusión comprende un primer segmento y un segundo segmento, en el que el primer segmento comprende el dominio D2 o un fragmento del mismo, y en el que el segundo segmento comprende al menos una proteína heteróloga seleccionada del grupo formado por una inmunoglobulina, una citocina, una proteína inmunomoduladora o péptido, un receptor de NK además de NKp46, una hormona, un factor de crecimiento y fragmentos de los mismos. Más preferiblemente la proteína heteróloga es un fragmento de inmunoglobulina, preferiblemente en el que el fragmento de inmunoglobulina es la región Fc de la IgG1 o preferiblemente en el que el dominio D2 o fragmento del mismo es seleccionado del grupo formado las SECs ID Nº 1 – 10 y 12 – 16; o la proteína de fusión comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo formado por las SECs ID Nº 17 – 22, o en la que la proteína de fusión comprende una variante del dominio D2 como el primer segmento, en el que la variante comprende al menos una sustitución de aminoácidos en el dominio D2 en un residuo seleccionado del grupo formado por treonina 125, treonina 225, lisina 157, lisina 170, arginina 160, arginina 166, histidina 163, asparagina 216, y una combinación de los mismos, donde los números corresponden a las posiciones residuales de la SEC ID Nº 29, preferiblemente donde la fusión de proteínas comprende la región Fc de la IgG1 como el segundo segmento; más preferiblemente donde el primer segmento comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo formado por las SECs ID Nº 12 – 16; o la citocina se selecciona del grupo formado por IL – 2, IL – 4 e IL – 10; o donde la proteína inmunomoduladora o péptido se selecciona del grupo formado por una proteína de choque térmico 60 (HSP60) o un fragmento de la misma, roquinimex, un antígeno de fijación al complemento de fiebre Q (QFA), un anticuerpo anti - CD3 y una combinación de los mismos; o donde el receptor NK además de NKp46 es NKG2D; o donde la hormona es seleccionada del grupo formado por insulina, glucagón y una combinación de los mismos.
- 40 [0032] La composición puede comprender un anticuerpo específico para la región extracelular de NKp46, el anticuerpo es un anticuerpo son deplecionar. Preferiblemente, el anticuerpo es específico del dominio D2; o el anticuerpo es seleccionado del grupo formado por un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de cadena sencilla y un anticuerpo humanizado; o la composición comprende una proteína que comprende un fragmento aislado de la región extracelular de NKp46; y un anticuerpo específico para la región extracelular de NKp46, en el que el anticuerpo es un anticuerpo sin deplecionar.
- 45 [0033] La diabetes tipo 1 puede seleccionarse del grupo formado por preinsulitis, insulitis temprana, prediabetes, diabetes manifiesta y una combinación de las mismas. Preferiblemente, la composición se administra siguiendo la detección de al menos uno de los niveles de glucemia en ayunas alterada y los niveles de tolerancia a la glucosa alterada en el sujeto; o se determinó antes o después la administración de la composición que comprende además al menos uno de los niveles de glucemia en ayunas y niveles de tolerancia a la glucosa en el sujeto; o la composición se administra como una única dosis o una dosis múltiple, preferiblemente en dosis múltiple en intervalos semanales; o la composición se administra por una vía seleccionada del grupo formado por las vías parenteral, oral, transdérmica y tópica; o la composición se administra en combinación con al menos un agente inmunomodulador o inmunoestimulador, preferiblemente en el que el agente inmunomodulador o inmunoestimulante es seleccionado del grupo formado por el bacilo de Calmette – Guérin (BCG), la proteína de choque térmico 60

(HSP60) o un fragmento de los mismos, roquinimex, un antígeno de fijación al complemento de fiebre Q (QFA), un anticuerpo anti - CD3, una galactosilceramida, un adyuvante y una combinación de los mismos.

5 [0034] Según otro aspecto, la presente invención presenta una proteína que comprende un fragmento aislado de la región extracelular de NKp46 para su uso en la prevención o tratamiento de la diabetes de tipo 1.

10 [0035] Según todavía otro aspecto, la presente invención presenta un anticuerpo específico de la región extracelular de NKp46 para su uso en la prevención o tratamiento de la diabetes de tipo 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo sin deplecionar.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0036]

15 La Figura 1 muestra resúmenes gráficos del marcaje de las células beta murinas con diversas proteínas de fusión, según la evaluación de la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células beta aisladas de las cepas BALB / c, C57BL / 6 y NOD, las últimas hembras prediabéticas de 8 semanas y 14 semanas (NOD – 8W y NOD – 14 W, respectivamente) se incubaron con proteínas de fusión CEA – Ig (control FP), Nkp46 – Ig, NCR1 – Ig o NKG2D – Ig, junto con un anticuerpo anti - GLUT – 2, donde el último de los cuales reconoce específicamente las células beta. Los gráficos son representativos de tres experimentos independientes de cada sistema probado.

La Figura 1 A resume la intensidad de fluorescencia media (MFI) del marcaje celular por cada proteína de fusión.

25 La Figura 1 B resume el porcentaje de células beta que expresa ligando para cada proteína de fusión.

La Figura 1 C resume cuatro subpoblaciones de células beta (G1, G2, G3, y G4) distinguidas con respecto a la expresión de los ligandos NCR – 1 y GLUT – 2.

30 La Figura 1 D muestra la citometría de flujo de los gates utilizados para determinar las subpoblaciones de células beta (G1, G2, G3 y G4) representadas en la Figura 1 C.

La Figura 2 muestra el análisis utilizando un ensayo del gen indicador BW.

35 Figura 2 A. Análisis de citometría de flujo de las células BW y BW transfectadas con NK – p46 – CD3 ζ , utilizando un anticuerpo monoclonal en NKp46 (histograma delineado en negro). El histograma gris es el antecedente de tinción del anticuerpo secundario.

40 Figura 2 B. Secreción de IL – 2 de las células BW o BW transfectadas con transfectadas con NK – p46 – CD3 ζ a las 48 horas de la incubación con las células beta derivadas de C57BL / 6, BALB / c o ratones NOD hembra prediabéticos, o con células HeLa de control. Los valores son medias de muestras triplicadas. Representativa de seis experimentos independientes.

45 La Figura 3 muestra que NKp46 – Ig reconoce a las células beta murinas y humanas *in situ*.

50 Figura 3 A. Se obtuvieron secciones integradas en parafina de tejidos pancreáticos a través de una autopsia de un humano no diabético y de ratones NOD y BALB / c hembra, teñidas con NKp46 – Ig o NKp46D1 – Ig (control FP). La ampliación es x200 para las imágenes principales y x50 para las inserciones. Los resultados son representativos de seis experimentos independientes.

55 Figura 3 B. Secciones integradas en parafina de los tejidos pancreáticos obtenidos en la etapa embrionaria E20 (parte superior; las flechas indican islotes) y ratones NOD hembra con edades de varias semanas (s) durante el desarrollo de la diabetes teñidas con NKp46 – Ig. La ampliación es x100 para las imágenes principales y x50 para las inserciones. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

60 Figura 3 C. Glándulas salivales derivadas de ratones NOD y BALB / c hembra y teñidas con NKp46 – Ig o NKp46D1 – Ig (control FP). La ampliación es x200 (panel superior), y x50 (paneles medio e inferior). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

65 Figura 3 D. Tejidos normales derivados de ratones NOD y BALB / c y teñidos con NKp46 – Ig. La ampliación es x100 (pulmón, hígado y tiroides), o x40 (músculo y bazo). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 3 E - G. Se incubaron secciones integradas en parafina de los tejidos pancreáticos derivados de ratones BALB / c (Figura 3 E), ratones NOD hembra (Figura 3 F) y de una autopsia de un humano no diabético (Figura 3G),

con anticuerpos antiinsulina marcados diferencialmente y NKp46 – Ig o NKp46D1 – Ig (control FP). Escalas: 10 μ m. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

5 Figura 3 H. Se incubaron secciones integradas en parafina de los tejidos pancreáticos derivados de ratones BALB / c con anticuerpos antiinsulina marcados diferencialmente, NKp46 – Ig y anticuerpos anti - somatostatina o antiglucagón. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

10 Figura 3 I. Tejidos del tiroides y del bazo de una autopsia de un humano no diabético teñidos con NKp46 – Ig, y tinción nuclear con el colorante DAPI intercalado en el ADN. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

La Figura 4 muestra destrucción mediada por NKp46 de las células beta.

15 Figura 4 A. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas de la secreción de IFN – y por células NK purificadas de ratones NCR – 1^{+/gfp} (KO) o ratones NCR – 1^{gfp/gfp} (HET) activadas con ácido poli - inosínico – poli – citidílico e incubadas durante 48 horas con células beta derivadas de ratones C57BL / 6, BALB / c o NOD prediabéticos hembra. RMS, línea celular de rhabdomiosarcoma inducida por metilcolantreno (control positivo). *p < 0,05 (prueba t de Student).

20 Figura 4 B. Se cocultivaron células NK de esplenocitos con diversas células beta, células YAC – 1 y HeLa, teñidas con aloficiocianina conjugada con anticuerpo CD107a y seleccionadas en células NK (GFP⁺ / CD3⁻). El experimento se realizó en un efector en una proporción diana de 1:1. Las células positivas CD107a se mostraron como el % del total de células NK. *p < 0,05.

25 Figura 4 C. Células NK obtenidas de los islotes pancreáticos (PNK) o de los ganglios linfáticos pancreáticos (PLN NK) de ratones NOD prediabéticos hembra de 12 semanas (n = 6 – 7) que se tiñeron con aloficiocianina conjugada con anticuerpo CD107a y seleccionada en las células positivas NCR -1. Las células positivas CD107a se muestran como el % total de células NK. *p = 0,0014.

30 **La Figura 5** muestra que el desarrollo de la diabetes es alterado en la ausencia de NKp46.

Figura 5 A. Análisis de Kaplan – Meyer del desarrollo de la diabetes en ratones NCR – 1^{+/gfp} (KO) o ratones NCR – 1^{gfp/gfp} (WT) tras la inyección de estreptozotocina (LDST). P < 0,010 (prueba logrank). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

35 Figura 5 B. Concentraciones de glucosa en sangre hasta 45 días después de la primera inyección de estreptozotocina. La línea discontinua representa los niveles de glucosa > 250 mg / dl. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

40 Figura 5 C. Grado de insulitis en NCR – 1^{+/gfp} (KO) o ratones NCR – 1^{gfp/gfp} (WT) 16 días después de la inyección de estreptozotocina (LDST). Los tejidos pancreáticos se evaluaron por el grado de insulitis calculado como el porcentaje de los islotes por ratón en cada etapa de insulitis (p = 0,043 por la prueba χ^2 de Pearson). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

45 **La Figura 6** muestra que las células NK se acumulan en el páncreas durante el desarrollo de la diabetes. Las células NK en el páncreas de ratones NOD hembra (modelo NOD; Figura 6 A) o ratones NCR – 1^{gfp/gfp} inyectados con estreptozotocina (modelo LDST; Figura 6 B) se identificaron por tinción con NCR – 1 antiratón (modelo NOD; Figura 6 A) o como células positivas de GFP (modelo LDST; Figura 6 B). Las células se tiñeron durante varias etapas de insulitis y desarrollo de la diabetes. Para cada etapa, los linfocitos se purificaron a partir de 2 – 3 tejidos pancreáticos derivados de ratones NOD hembra y ratones NCR – 1^{gfp/gfp}, excepto en las etapas embrionarias y preinsulitis para las que se utilizaron 8 – 10 tejidos pancreáticos. Los gráficos resumen los porcentajes medios de las células NK obtenidas de tres experimentos independientes en cada modelo.

55 **La Figura 7** muestra que el tratamiento con proteínas de fusión NKp46 evita el desarrollo de diabetes en ratones NOD. El desarrollo de diabetes (nivel de glucosa en sangre por encima de 250 mg / dl en dos mediciones consecutivas) en ratones NOD tratados con NKp46 – Ig (círculos), NCR – 1 (triángulos) o NCR1 – t (cuadrados), cada uno se inyectaron a 0,005 g / kg de peso corporal por vía intraperitoneal dos veces a la semana, o PBS (rombos en negro) comenzando a las 6 semanas hasta las 24 semanas (s) de edad (tratamiento (Tx) flechas superiores). P < 0,0002, proteína de fusión contra PBS (análisis de Kaplan – Meyer, prueba logrank). Los datos son representativos de dos experimentos independientes con 8 – 9 ratones por grupo.

La Figura 8 muestra una función de NKp46 alterada.

65 La Figura 8 A muestra la expresión CD107a de las células aisladas de los esplenocitos NOD preincubados con suero (eje horizontal) y luego se incubó con células beta en un efector: proporción diana 1:1. Las células NK se

identificaron por la expresión NCR -1. Las células CD107a⁺ se presentan como el % total de células NK. **p < 0,05 (prueba t de Student). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

5 La Figura 8 B muestra la citometría de flujo de las células NK derivadas de esplenocitos de ratones tratados con proteína de fusión (histograma delineado en negro) o ratones tratados con PBS (histogramas en gris) a las 36 semanas de edad y se tiñeron con anti - NCR-1. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

10 Figuras 8 C y 8 D. Células CD107a⁺ entre células NK derivadas de los esplenocitos de ratones de 36 semanas tratados con PBS o proteína de fusión, se trataron los diversos grupos con NKp46 y el grupo PBS a las 36 semanas, incubadas con células beta (Figura 8 C) y varias células diana (Figuras 8 D) en un efecto: proporción diana 1:1 y teñidas con aloflicocianina conjugada con anticuerpo anti - CD107a. Los gráficos son seleccionados en las células positivas NCR -1. Las células CD107a⁺ se muestran como el % total de células NK. **p < 0,001 (prueba t de Student). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

15 15 La Figura 9 muestra que el tratamiento de NKp46 en una etapa tardía prediabética previene el desarrollo de la diabetes.

20 Figura 9 A. Desarrollo de diabetes en ratones NOD tratados con NKp46 – Ig (cuadrados en gris), NCR1 – Ig (triángulos en negro), CEA – IG (control FP; círculos) o PBS (rombos en negro) comenzando a las 11 – 12 semanas (s) de edad y continuando hasta las 20 semanas (n = 8 – 9 por grupo). P < 0,001, NKp46 – Ig y NCR1 – Ig contra control FP y PBS (análisis de Kaplan – Meyer, prueba logrank). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

25 Figura 9 B. Células NK aisladas de linfocitos de sangre periférica de ratones de 16 semanas tratados (tratamiento mostrado en el eje x) y teñidas con anticuerpo de cabra NCR -1 antiratón. Se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la tinción de NCR1. *p < 0,05 (prueba t de Student). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

30 Figura 9 C. Células CD107a⁺ entre las células NK patogénicas derivadas de los islotes de ratones tratados y teñidas con CD107a. Los gráficos son seleccionados en las células NCR -1⁺. Las células CD107a⁺ se muestran como el % total de células NK. *p < 0,03 para CEA – Ig contra NCR1 – Ig, y p < 0,007 para CEA – Ig contra NKp46 - Ig (prueba t de Student). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

35 [0037] Los presentes inventores revelaron en la presente por primera vez que una proteína de fusión que contiene el dominio D2 de NKp46 fusionado a la parte Fc de la IgG es eficaz para la prevención de la diabetes tipo 1, cuando se administra en la etapa prediabética temprana o tardía. Además, se revela en la presente por primera vez que en una realización alternativa, la diabetes de tipo 1 puede evitarse mediante la administración de anticuerpos específicos para el dominio D2 de NKp46.

Definiciones

45 [0038] El término “NKp46” tal y como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier homólogo humano o no humano, ortólogo o isoforma del receptor de citotoxicidad natural humano conocido como NKp46, que incluye por ejemplo aquellos con los números de acceso GenBank CAA04714; CAA06872; CAA06873; CAA06874; AAH42788 o NP_034876.

50 [0039] Los términos “sujeto” y “paciente” tal y como se utilizan en la presente, se refieren a cualquier sujeto individual para el que se desea la prevención o tratamiento de diabetes, que incluyen humanos y mamíferos no humanos, como primates, bovinos, ovinos, caninos, felinos y roedores. También se incluyen sujetos implicados en los ensayos de investigación clínica que no muestran signos clínicos de enfermedad, o sujetos implicados en estudios epidemiológicos, o sujetos utilizados como controles.

55 [0040] Los términos “anticuerpo sin deplecionar” y “anticuerpo no citotóxico” se refieren indistintamente a un anticuerpo que no asesina sustancialmente, destruye o elimina una célula portadora del antígeno específico que se reconoce por el anticuerpo particular. Se entiende que la célula puede ser un organismo unicelular, o puede ser una célula de un organismo multicelular, y abarca a células sustancialmente aisladas del organismo y / u órgano de origen.

60 [0041] Las formas singulares “un / una”, y “el / la” incluyen referentes plurales a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, referencia a “un anticuerpo” incluye uno o más de dichos anticuerpos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia, etc.

65 Diabetes

- 5 [0042] La diabetes tipo 1 (también conocida como diabetes inmunomediada) se caracteriza por la pérdida de células beta productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas dando como resultado la deficiencia de insulina. La diabetes tipo 1 se asocia a un ataque autoinmune mediado por células T en células beta, y no se conocen medidas de prevención para la enfermedad, que causa aproximadamente el 10 % de los casos de diabetes en Norte América y Europa. Las personas más afectadas están saludables y tienen un peso saludable cuando se produce el inicio de esta. La sensibilidad y reactividad a la insulina son normales, especialmente en las etapas tempranas. La diabetes tipo 1 puede afectar tanto a niños como a adultos pero se denominó tradicionalmente "diabetes juvenil" ya que representa la mayoría de los casos de diabetes en niños.
- 10 [0043] Diabetes tipo 2 (anteriormente conocida como diabetes mellitus no insulinodependiente (DMNID), o diabetes del adulto) es un trastorno caracterizado por la glucosa en sangre alta en el contexto de resistencia a la insulina y la deficiencia relativa de insulina. Los factores de riesgo asociados con la incidencia de diabetes tipo 2 incluyen obesidad, hipertensión, colesterol alto (hiperlipidemia combinada), síndrome metabólico y antecedentes genéticos. La diabetes tipo 2 representa alrededor del 90 % de los casos de diabetes en EE. UU., y ha aumentado de manera significativa en la incidencia durante las últimas décadas, debido principalmente a factores de estilo de vida.
- 15 [0044] Los síntomas clásicos de diabetes son poliuria (micción frecuente), polidipsia (aumento de la sed) y polifagia (aumento del apetito). Los síntomas pueden desarrollarse con bastante rapidez (semanas o meses) en la diabetes tipo 1, en particular en niños. Sin embargo, los síntomas de la diabetes tipo 2 se desarrollan generalmente de forma más lenta y pueden ser sutiles o completamente ausentes. La diabetes (los dos tipos) puede también causar una rápida pérdida significativa de peso (a pesar de una alimentación normal o aumentada) y fatiga mental irreducible.
- 20 [0045] Los pacientes con diabetes tipo 1 pueden asimismo presentar inicialmente cetoacidosis diabética, un estado extremo de la desregulación metabólica caracterizada por el olor de acetona en el aliento del paciente; una rápida y profunda respiración conocida como respiración de Kussmaul; poliuria, náuseas, vómitos y dolor abdominal; y cualesquiera de los muchos estados alterados de conciencia o excitación. En casos graves, a esto puede seguir coma, hasta la morir.
- 25 [0046] El diagnóstico final de la diabetes de tipo 1 y tipo 2 se realiza determinando las concentraciones de glucosa en sangre.
- 30 [0047] Tal y como se utiliza en la presente, el término "diabetes manifiesta" se refiere a un diagnóstico de diabetes completa en un sujeto basado en los niveles de glucosa en plasma, por ejemplo, en humanos con un nivel de glucosa en plasma en ayunas $\geq 7,0 \text{ mmol / l}$ (126 mg / dl); o en una prueba de tolerancia a la glucosa oral, 2 horas después de la ingesta de una dosis oral de 75 g, un nivel de glucosa en plasma $\geq 11,1 \text{ mmol / l}$ (200 mg / dl); o síntomas de hiperglucemía y nivel de glucosa en plasma casual $\geq 11,1 \text{ mmol / l}$ (200 mg / dl); o estándares equivalentes determinados para especies no humanas. Los mencionados anteriormente son criterios de diagnóstico ampliamente aceptados para la diabetes humana (Organización Mundial de la Salud 2006. Definición y diagnóstico de diabetes mellitas e hiperglucemias intermedias. Ginebra, Suiza). La hemoglobulina glicosilada (hemoglobulina A1C) igual o superior a 6,5 % puede también considerarse un diagnóstico para la diabetes humana, a pesar de no ser aceptada de manera uniforme entre las organizaciones de salud (Mayfield Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: New Criteria. Am Fam Physician. 1998 Oct 15; 58(6): 1355 - 62, 1369 - 70).
- 35 [0048] Tal y como se utiliza en la presente, el término "prediabetes" se refiere a la ocurrencia de cualquiera o ambas de glucosa en ayunas alterada y tolerancia de glucosa alterada en un sujeto. Por ejemplo en humanos, un nivel de glucosa en ayunas que oscila entre 100 y 125 mg / dL ($5,6$ a $6,9 \text{ mmol / L}$) es indicativo de glucosa en ayunas alterada, y un nivel de glucosa en plasma en o por encima de 140 mg / dL ($7,8 \text{ mmol / L}$), pero no más de 200 mg / dL ($11,1 \text{ mmol / L}$), dos horas después de una carga de 75 g de glucosa oral, es indicativo de tolerancia de glucosa alterada. El término también abarca los estándares equivalentes determinados para las especies no humanas.
- 40 [0049] Tal y como se utiliza en la presente, el término "hiperinsulinemia" se refiere a la aparición de niveles elevados de insulina circulante, por ejemplo un valor de insulina sérica en ayunas por encima de $19 \mu\text{U} / \text{ml}$ para humanos, o el estándar equivalente determinado por las especies no humanas. La hiperinsulinemia es un marcador de resistencia a la insulina, un correlato del síndrome metabólico, y un precursor establecido de diabetes tipo 2 (Carnethon et al., Risk Factors for Progression to Incident Hyperinsulinemia: The Atherosclerosis Risk in Communities Study, 1987 - 1998).
- 45 [0050] Tal y como se utiliza en la presente, el término "insulitis" se refiere a la ocurrencia de la infiltración linfocítica en los islotes de Langerhans, de manera que los islotes afectados han perdido la mayoría de sus masas – células beta y sólo tienen células beta residuales (por ejemplo, se conserva menos del 20 % de masa – célula beta). Del mismo modo, los términos "preinsulitis" e "insulitis temprana" se refieren a las etapas tempranas de la infiltración linfocítica caracterizadas por un menor grado de pérdida de células beta, de manera que la masa – células beta conservada en la preinsulitis es de 60 a más del 80 %, y en la insulitis temprana oscila entre el 20 y el 60 %.

Proteínas NKp46 y producción de las mismas

- 5 [0051] Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan en la presente indistintamente para referirse a formas poliméricas de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos modificados química o biológicamente derivatizados, y polipéptidos que tienen segmentos principales peptídicos modificados. El término incluye proteínas de fusión, que incluyen, pero no se limitan a proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas u homólogas, con o sin residuos de metionina N – terminal; proteínas marcadas inmunológicamente; y similares.
- 10 [0052] Una proteína de interés o fragmento de la misma para su uso en la presente invención puede obtenerse en una forma aislada por la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polinucleótico o por síntesis química. Tal y como se utiliza en la presente, el término "aislado" describe un compuesto de interés (por ejemplo un polipéptido) que está en un entorno diferente en el que el compuesto ocurre naturalmente o se produce. "Aislado" incluye componentes que están en muestras que son sustancialmente enriquecidas por el compuesto de interés y / o en el que el compuesto de interés está parcial o sustancialmente purificado.
- 15 [0053] Tal y como se utiliza en la presente, una "proteína de fusión" o "péptido químérico" se refiere a una proteína o polipéptido que comprende un primer segmento que es una primera proteína de origen natural o polipéptido o un fragmento de la misma fusionada a un segundo segmento que es una proteína o polipéptido diferente o un fragmento de los mismos fusionado. Una proteína de fusión para su uso en la invención que contiene el dominio D2 de NKp46 o una parte de unión al ligando de la misma fusionado con la región Fc de la IgG1, ejemplos incluidos en las SECs ID Nº 17 – 22.
- 20 [0054] Tal y como se utiliza en la presente, un "conjugado de proteína" o "multímero de proteína" se refieren indistintamente a una estructura de complejo de dos o más cadenas polipeptídicas asociadas es decir, subunidades de proteínas, opcionalmente comprenden uno o más enlaces o separadores. Las subunidades pueden ser distintas entre sí pero también pueden ser idénticas al menos algunas subunidades, y las asociaciones entre y en medio de varias subunidades y enlaces pueden ser covalentes, no covalentes, iónicas u otros tipos de interacciones.
- 25 [0055] El término "molécula de ácido nucleico recombinante" tal y como se utiliza en la presente se refiere a una molécula de ácido nucleico que se compone de segmentos de ácido nucleico unidos por medios de técnicas biológicas moleculares.
- 30 [0056] El término "proteína recombinante" o "polipéptido recombinante" tal y como se utiliza en la presente se refiere a una molécula proteica que se expresa a partir de una molécula de ácido nucleico recombinante. El polipéptido NKp46 puede ser una región extracelular completa de cualquier proteína NKp46. El polipéptido NKp46 puede incluir los dominios D1 y D2 de la región extracelular, o puede limitarse al dominio D2 y estar sustancialmente desprovisto del dominio D1, por ejemplo, como en las SECs ID Nº 1 – 4, o puede incluir una parte pequeña de D1 y una parte mayor de D2, por ejemplo, como en las SEC ID Nº 5, o puede corresponder a un fragmento relativamente corto de D2, por ejemplo, como en las SECs ID Nº 6 – 8.
- 35 [0057] Un dominio D2 para su uso en la invención puede ser seleccionado de la SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 9 y SEC ID Nº 10. En realizaciones particulares, un fragmento aislado para su uso en la invención comprende una secuencia aminoácida seleccionada de las SECs ID Nº 1 – 10.
- 40 [0058] Los polipéptidos comprendidos por la invención incluyen asimismo proteínas de fusión que contienen una región extracelular o un fragmento del mismo fusionado en una secuencia aminoácida no relacionada. Las secuencias no relacionadas pueden ser dominios funcionales adicionales o péptidos señal. Por ejemplo, una proteína de fusión puede incluir el dominio D2 o un fragmento del mismo como primer segmento, y al menos una proteína heteróloga como segundo fragmento. Ejemplos de proteínas heterólogas adecuadas incluyen inmunoglobulinas, citocinas, proteínas inmunomoduladoras o péptidos, un receptor NK además de NKp46, hormonas, factores de crecimiento y fragmentos de los mismos. En una realización particular, la proteína heteróloga es la región Fc de la IgG1.
- 45 [0059] Los polipéptidos pueden ser aquellos con sustituciones conservativas de aminoácidos, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10 o más sustituciones. Las sustituciones conservativas incluyen normalmente sustituciones en los siguientes grupos: glicina y alanina, valina, isoleucina, y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Los polipéptidos pueden ser además aquellos con delecciones o adiciones de aminoácidos, siempre que dichas mutaciones no resten valor sustancialmente de la capacidad de la proteína NKp46 en la función de prevenir o tratar la diabetes, en comparación con la proteína de tipo salvaje.
- 50 [0060] Las sustituciones aminoácidas pueden realizarse para eliminar los sitios de glicosilación en el domino D2. Dichas sustituciones se revelan por ejemplo en la publicación de solicitud de patente EE. UU Nº 2007 / 0203054. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse para eliminar ciertos sitios de unión al ligando en el dominio D2,
- 55
- 60
- 65

como los sitios de unión a heparina. Dichas sustituciones se revelan por ejemplo en el documento 2005/051973. Las sustitución de aminoácidos puede ser en un residuo seleccionado de treonina 125, treonina 225, lisina 157, lisina 170, arginina 160, arginina 166, histidina 163, asparagina 216, o una combinación de los mismos, donde los números corresponden a las posiciones residuales de NKp46 de la SEC ID Nº 29. Ejemplos de una sustitución aminoácida incluyen T125A; T225A; T225S; T225N; K157Q; R160Q; H163Q; R166Q; K170T; N216A y cualquier combinación de los mismos; donde los números corresponden a las posiciones residuales de NKp46 de la SEC ID Nº 29. Se debe entender que en las proteínas y los fragmentos utilizados para la invención, los números de posición de los aminoácidos pueden diferir de los anteriormente mencionados, según el uso de secuencias que difieren de la SEC ID Nº 29, los últimos corresponden a la isoforma a NKp46 completa.

[0061] Ejemplos de fragmentos de proteína NKp46 que tienen varias sustituciones aminoácidas en la variante del dominio D2 incluyen las SECs ID Nº 12 – 17. En una realización particular, la proteína de fusión comprende una variante del dominio D2 como primer segmento, en el que la variante comprende al menos una sustitución aminoácida en el dominio D2. En una realización particular, la proteína de fusión comprende la variante del dominio D2 como primer segmento, y además comprende la región Fc de la IgG1 como segundo segmento. Las proteínas de fusión comprenden una variante del dominio D2 que incluye las de las SECs ID Nº 18 – 22.

[0062] Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se utilizan indistintamente en la presente para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, que incluyen pero no se limitan a, ADN o ARN monocatenario, bicatenario o multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos ADN – ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales, o bases nucleótidas derivatizadas. Se incluyen además ARNm o ADNc que comprenden secuencias intrónicas (véase por ejemplo Niwa et al. (1999) Cell 99(7): 691 - 702). El segmento principal del polinucleótido puede comprender grupos de azúcar y fosfato (como se encuentran normalmente en el ARN o ADN), o grupos fosfato o de azúcar modificados o sustituidos. Alternativamente, el segmento principal del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas como fosforamitidas y por lo tanto puede ser un oligómero oligodesoxinucleósido fosforamidato o un oligómero mixto de fosforamidato – fosfodiéster mezclado. Peyrottes et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24:1841 - 1848; Chaturvedi et al (1996) Nucl. Acids Res. 24: 2318 - 2323. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares, y grupos de unión como fluororibosa y tioato, y ramas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse además después de la polimerización, como por conjugación con un componente de marcaje, por recubrimiento, por sustitución de uno o más nucleótidos que se producen de forma natural con un análogo, y por introducción de medios para la unión del polinucleótido a las proteínas, iones metálicos, componentes de marcaje, otros polinucleótidos, o un soporte sólido.

[0063] Un gen o proteína NKp46 pueden identificarse basándose en su similitud con el gen o proteína NKp46, respectivamente. Las características de la invención utilizadas de los fragmentos del dominio D2 NKp46 aislados son al menos idénticas al 50 % (o 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 98 %) a las secuencias de aminoácidos de las SECs ID Nº 1 – 10. Dichos polipéptidos pueden producirse por métodos recombinantes utilizando ácidos nucleicos que codifican al correspondiente polipéptido, o pueden extraerse alternativamente a partir de los tejidos, o producirse químicamente. La determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias se consigue utilizando el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877. Dicho algoritmo se incorpora a los programas BLASTN y BLASTP de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215,403 - 410. Las búsquedas nucleótidas de BLAST se realizan con el programa BLASTN para obtener homólogos de secuencias nucleótidas en NKp46 que codifican ácidos nucleicos. Las búsquedas de las proteínas en BLAST se realizan con el programa BLASTP para obtener homólogos de secuencias de aminoácidos en el polipéptido NKp46. Para obtener alineamientos *gapped* para fines comparativos, se utilizó Gapped BLAST tal y como se describe en Altschul et al (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 - 3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros por defecto de sus respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

[0064] La hibridación puede utilizarse también como medida de la homología entre dos secuencias de ácido nucleico. Un NKp46 que codifica una secuencia de ácido nucleico, o una parte de la misma, puede utilizarse como una sonda de hibridación según las técnicas de hibridación estándar. La hibridación de una sonda NKp46 en ADN o ARN de la fuente de prueba (por ejemplo, una célula de mamífero) es un indicativo de la presencia de ADN o ARN de NKp46 en la fuente de prueba. Las condiciones de hibridación son conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1 - 6.3.6, (1991)).

[0065] Pueden producirse vectores de expresión de NKp46 recombinantes que contienen un dominio D2 de NKp46 que codifica la secuencia operablemente unida a elementos reguladores transcripcionales / traduccionales. Pueden utilizarse métodos ya conocidos por los expertos en la materia para construir dichos vectores de expresión (Véanse, por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., (1989); y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., (1989)).

[0066] Los ácidos nucleicos que codifican NKp46 pueden obtenerse a partir de células de un sujeto humano o no humano, en particular células NK, utilizando cebadores oligonucleótidos y técnicas de amplificación, y el ADN amplificado se une a un vector de expresión apropiado.

5 [0067] Los vectores de expresión pueden codificarse, además en un polipéptido NKp46, una segunda secuencia no relacionada a NKp46, como un indicador, un marcador, un péptido señal, o una secuencia proteica heteróloga útil para la prevención o tratamiento de la diabetes. Las moléculas de ácido nucleico recombinantes pueden contener una secuencia señal que es la secuencia señal nativa de NKp46 o una secuencia señal heteróloga. El polipéptido NKp46 completo, o un fragmento del mismo, puede fusionarse a dichas secuencias señal y / o polipéptidos adicionales. Del mismo modo, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden codificar la forma madura de NKp46 o una forma que incluye un polipéptido exógeno que facilita la secreción.

10 [0068] En consecuencia, el ácido nucleico que codifica NKp46 puede formar parte de un gen híbrido que codifica secuencias polipeptídicas adicionales. Generalmente, el gen híbrido codificará un polipéptido con un primer segmento y un segundo segmento; el primer segmento es un fragmento de NKp46 y la segunda porción es por ejemplo, una inmunoglobulina, una citocina, una proteína inmunomoduladora o péptido, un receptor NK además de NKp46, una hormona, un factor de crecimiento o un fragmento de los mismos. Un ejemplo de fragmento de la proteína heteróloga adecuado es un fragmento de inmunoglobulina, en particular la región Fc de la IgG1. En una realización particular, el gen híbrido codifica una proteína de fusión que comprende el dominio D2 o un fragmento del mismo como primer segmento, y la región Fc de la IgG1 como segundo segmento. Los polinucleótidos útiles para la producción de proteínas de fusión de la invención incluyen las SECs ID Nº 23 – 28.

15 [0069] Los sistemas de expresión que pueden utilizarse para la producción de NKp46 y otras proteínas recombinantes incluyen pero no se limitan a microorganismos como bacterias, levaduras, sistemas celulares de plantas, sistemas celulares de insectos o sistemas celulares de mamíferos, que pueden ser transformados, infectados o transfectados, según sea el caso, con vectores de expresión recombinantes apropiados o constructos que contienen una molécula de ácido nucleico relevante. También son útiles como células huésped células primarias o secundarias obtenidas directamente de un mamífero y transfectadas con un vector plásmido o infectadas con un vector viral.

20 [0070] Pueden entonces utilizarse las células transfectadas o transducidas con dichos vectores de expresión, por ejemplo, para escalas grandes o pequeñas de la producción *in vitro* de un polipéptido NKp46 o fragmento del mismo por métodos conocidos en la disciplina. Dichos métodos implican el cultivo de células en condiciones que maximizan la producción del fragmento polipéptido o antigénico y lo aislan de las células o del medio de cultivo.

Anticuerpos

25 [0071] El término "anticuerpo" se utiliza en este documento en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos de cadena única y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv), siempre y cuando se unan específicamente a un antígeno diana o epítopo de interés.

30 [0072] El término "epítopo", como se usa aquí se refiere a esa porción de un antígeno que es reconocido específicamente por un anticuerpo particular y hace contacto con la región de unión a antígeno de ese anticuerpo. Cuando una proteína o un fragmento de una proteína es inmunogénica en un animal huésped, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región dada o estructura tridimensional en la proteína; estas regiones o estructuras se conocen como "epítopos" o "determinantes antigenicos". Un determinante antigenico puede competir con el antígeno intacto que provocó la respuesta inmune, para la unión a un anticuerpo. Un epítopo puede ser en sí mismo una región de un anticuerpo, por ejemplo, la región de unión a antígeno, o una región Fc específica de la especie.

35 [0073] El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigenico. Además, en contraste con (policlonales) las preparaciones de anticuerpos convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a utilizar según la presente invención se pueden hacer por el procedimiento del hibridoma descrito primero por Kohler et al. (1975) Nature 256: 495, o puede hacerse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº.4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos, como se conoce en la técnica, por ejemplo usando técnicas como las descritas en Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628 y Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581 - 597.

[0074] Las formas "humanizadas" (por ejemplo, murino) de anticuerpos no humanos son anticuerpos químéricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, opcionalmente, al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature* 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323 - 329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593 - 596 (1992).

[0075] Los anticuerpos químicos se preparan típicamente mediante corte y empalme de los genes (de una especie) para una molécula de anticuerpo específico para un antígeno particular, junto con genes de otras especies de moléculas de anticuerpos con actividad biológica apropiada. Puede ser deseable transferir las regiones de unión a antígeno (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, o regiones hipervariables) de anticuerpos de una especie en el marco de un anticuerpo de otras especies mediante técnicas de ADN recombinante para producir una molécula química. Los métodos para producir tales moléculas se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°. 4.816.567; 4.816.397; 5.693.762, y 5.712.120. Un anticuerpo monoclonal humano o una(s) porción(es) del mismo se pueden identificar mediante el cribado de una biblioteca de ADNc de células B humanas de moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno asociado a un tumor según el método general establecido por Huse et al. (*Science* 246: 1275 81 (1989)). La molécula de ácido nucleico puede entonces clonarse y amplificarse para obtener secuencias que codifican el anticuerpo (o el dominio de unión al antígeno) de la especificidad deseada. La tecnología de visualización de fagos ofrece otra técnica para la selección de anticuerpos que se unen a antígenos asociados a tumores, fragmentos, derivados o análogos de los mismos (véase, por ejemplo, publicaciones de patente internacional WO 91/17271 y WO 92/01047; Huse et al., supra.)

[0076] Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena única se describen por ejemplo en las patentes de EE.UU. N° 4.946.778 y 5.969.108.

[0077] Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para, al menos, dos antígenos diferentes. Por ejemplo, una de las especificidades de unión puede ser para NKp46D2 y la otra es para cualquier otro antígeno, por ejemplo, un receptor un receptor de NK diferente, por ejemplo, NKG2D. Los métodos de generación de anticuerpos biespecíficos se describen, por ejemplo, en Suresh et al., (*Methods in Enzymology* 121: 210 (1986)).

[0078] Los anticuerpos producidos mediante cualquier método se pueden purificar por métodos conocidos, como se describe por ejemplo, en Harlow y Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1999).

[0079] Los términos "interactúa específicamente" y "se une específicamente" y los términos relacionados gramaticales se utilizan aquí de forma intercambiable para referirse a alta avidez y / o alta afinidad de unión entre un anticuerpo y su epítopo. La unión de un anticuerpo a su epítopo es más fuerte que la unión del mismo anticuerpo a cualquier otro epítopo, particularmente aquellos que pueden estar presentes en moléculas en asociación con, o en la misma muestra, que el polipéptido específico de interés. Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de interés pueden ser capaces de unirse a otros polipéptidos a un nivel débil, pero todavía detectable (por ejemplo, al 10% o menos de la unión mostrada al polipéptido de interés). Esta unión débil, o unión de fondo, es fácilmente discernible de la unión específica del anticuerpo al compuesto o polipéptido de interés, por ejemplo, mediante el uso de controles apropiados.

[0080] En realizaciones particulares, la invención implica la detección de anticuerpo específico para NKp46 en una muestra de fluido biológico de un sujeto, después de la administración al sujeto de una composición que comprende un fragmento de proteína aislada de la región extracelular de NKp46. En otras formas de realización, los métodos de la invención comprenden la administración pasiva de anticuerpos preparados para el sujeto.

[0081] Las muestras de fluidos biológicos incluyen sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, semen, lágrimas o moco. En realizaciones particulares, la muestra de fluido biológico es plasma o suero.

[0082] Las muestras preparativas incluyen las obtenidas de los sistemas utilizados para la producción de anticuerpos, tales como, por ejemplo, líquido ascítico, sobrenadantes de cultivo de células, sobrenadantes de la biblioteca de fagos y las formas secretadas de los mismos.

[0083] Los inmunoensayos para la detección de muestras del anticuerpo específico para NKp46 o el anticuerpo específico a D2 de NKp46 (también denominados respectivamente en la presente como "anticuerpo anti - NKp46" y "anticuerpo anti - NKp46D2") son conocidos en la técnica y se pueden utilizar fácilmente para la detección de anticuerpos según la presente invención. Los inmunoensayos adecuados incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayos, (RIA), inmunoensayos fluorescentes, (FIA), ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayos tipo "sándwich", reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación y ensayos de inmunoelectroforesis (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1999)).

[0084] La detección del anticuerpo anti - NKp46 puede llevarse a cabo utilizando la resonancia de plasmón superficial, en la que se expone a la muestra el NKp46 unido a un sustrato sólido apropiado. La unión del anticuerpo específico para NKp46 en el sustrato sólido dan como resultado un cambio en la intensidad de la resonancia de plasmón superficial, que se puede detectar cualitativa o cuantitativamente mediante un instrumento apropiado, por ejemplo, un aparato Biacore™.

Composiciones y métodos de administración farmacéuticas

[0085] Para su uso en los métodos de la invención, se pueden formular un fragmento de proteína NKp46, una proteína de fusión o un anticuerpo específico para un fragmento de proteína NKp46 de una manera convencional usando uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, estabilizadores o excipientes (vehículos) para formar una composición farmacéutica como se conoce en la técnica, en particular con respecto a los agentes activos de la proteína. Los portadores son "farmacéuticamente aceptables" en el sentido de que son compatibles con los otros ingredientes de la composición y no perjudican al receptor de los mismos.

[0086] Los portadores adecuados típicamente incluyen solución salina, etanol, aceites como glicerol o propilenglicol, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación también puede incluir otros portadores, adyuvantes, o, estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad de proteína o sus anticuerpos, que previenen o mejoran los síntomas de la diabetes tipo 1. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y LD50 (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación LD50 / ED50.

[0087] Otros ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, como emulsiones de aceite en agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles etc. Las composiciones que comprenden tales portadores se pueden formular por métodos convencionales bien conocidos.

[0088] La proteína se puede formular en forma neutra o como sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres) y que se forman con ácidos inorgánicos como ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico y maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas como sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2 - etilamino etanol, histidina y procaína.

[0089] Las composiciones se pueden formular adecuadamente para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, o intraperitoneal y comprenden convenientemente soluciones acuosas estériles de la proteína, que son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor. Dichas formulaciones se preparan típicamente disolviendo el ingrediente activo sólido en agua que contiene sustancias fisiológicamente compatibles como cloruro sódico, glicina, y similares, y que tiene un pH tamponado compatible con las condiciones fisiológicas para producir una solución acuosa, y que convierten dicha solución en estéril. Estas se pueden preparar en recipientes unitarios o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas selladas o viales.

[0090] Las composiciones pueden incorporar un estabilizador, como, por ejemplo, polietilenglicol, proteínas, sacáridas (por ejemplo, trehalosa), aminoácidos, ácidos inorgánicos y mezclas de los mismos. Los estabilizadores se utilizan en soluciones acuosas con la concentración y el pH apropiados. El pH de la solución acuosa se ajusta para que oscile entre 5,0 - 9,0, preferiblemente entre 6 - 8. En la formulación de la proteína, puede utilizarse un agente antiabsorción. Otros excipientes adecuados pueden incluir típicamente un antioxidante como ácido ascórbico.

[0091] Las composiciones se pueden formular como preparaciones de liberación controlada que puede lograrse mediante el uso de polímeros para complejar o absorber las proteínas. Los polímeros adecuados para formulaciones de liberación controlada incluyen, por ejemplo, poliéster, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, acetato de

5
10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

etilenvinilo, y metilcelulosa. Otro método posible para la liberación controlada es incorporar el anticuerpo en partículas de un material polimérico como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli (ácido láctico) o copolímeros de etileno y acetato de vinilo. Alternativamente, en lugar de incorporar estos agentes en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli (metilmetacrilato) respectivamente, o en sistemas de liberación de fármacos coloidales, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, o nanocápsulas o en macroemulsiones.

5 [0092] La composición de la invención puede administrarse preferiblemente por vía parenteral, como mediante
10 inyección, infusión intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

15 [0093] Los anticuerpos se administran generalmente en un intervalo de 0,1 a 20 mg / kg de peso del paciente, comúnmente de 0,5 a 10 mg / kg, y con frecuencia de 1 a 5 mg / kg. A este respecto, es preferible utilizar proteínas con una semivida en circulación de al menos 12 horas, preferiblemente de al menos 4 días, más preferiblemente de hasta 21 días. En algunos casos, puede ser ventajoso administrar una dosis de carga alta seguida de dosis periódicas de mantenimiento (por ejemplo, semanalmente) durante el período de tratamiento. Las proteínas, que incluyen anticuerpos pueden liberarse mediante los sistemas de liberación lenta, bombas y otros sistemas de administración conocidos para la infusión continua. Los regímenes de dosificación pueden variarse para proporcionar los niveles de circulación deseados de una proteína en particular sobre la base de su farmacocinética. Por lo tanto, se calcularán las dosis de manera que se mantenga el nivel de circulación deseada de agente terapéutico.

20 [0094] Las composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos de la invención pueden, alternativamente, prepararse y administrarse en formulaciones adecuadas para la administración oral, tópica o transdérmica.

25 [0095] Cuando se desean preparaciones orales, las composiciones pueden combinarse con excipientes, como lactosa, sacarosa, almidón, talco estearato de magnesio, celulosa cristalina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, glicerina, alginato sódico o goma arábiga.

30 [0096] Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden fabricar de una manera que es en sí conocida para los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, granulación, elaboración de grageas, encapsulación de gelatina blanda, disolución, extracción, o liofilización.

35 [0097] Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos como sacáridos, por ejemplo, lactosa o sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa y / o fosfatos de calcio, por ejemplo, fosfato tricálcico o fosfato cálcico de hidrógeno; así como aglutinantes, tales como pasta de almidón, usando, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y / o pirrolidona de polivinilo. Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes, como los almidones mencionados anteriormente y también carboximetil - almidón, polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo, como alginato de sodio. Los auxiliares son agentes reguladores del flujo y lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico o sales del mismo, como estearato de magnesio o estearato de calcio, y / o polietilenglicol. Los núcleos de las grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados que, si se desea, pueden ser resistentes a los jugos gástricos. Para este propósito, se pueden usar soluciones de sacárido concentradas, que pueden contener opcionalmente goma, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y / o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes arábiga. Con el fin de producir recubrimientos resistentes a los jugos gástricos, se usan soluciones de preparaciones de celulosa adecuadas, tales como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmelcelulosa, celulosa. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de las grageas, por ejemplo, para la identificación o para caracterizar combinaciones de dosis de compuestos activos.

40 [0098] Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente ciertas formas de realización de la invención. Sin embargo, estos no deben considerarse, de ninguna manera, como limitativos del amplio alcance de la invención. Un experto en la técnica puede idear fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios descritos en este documento sin apartarse del alcance de la invención.

55 EJEMPLOS

[0099] Los siguientes métodos se emplearon en los Ejemplos descritos en este documento.

60 [0100] Ratones. Se describió previamente (23) la generación de ratones knockout NKp46. Todos los experimentos se realizaron en una unidad específica, libre de patógenos, de la Hebrew University Hadassah Medical School (Ein - Kerem, Jerusalén, Israel), según las directrices del comité de ética local.

65 [0101] Células y proteínas de fusión. Las líneas celulares utilizadas fueron: HeLa (carcinoma de cuello uterino humano); BW (timoma murino) y transfectantes de BW; RMA - s; PD1.6; YAC - 1; RMS (rhabdomiosarcoma inducido por metilcolantreno) y 721.221 (línea celular B transfectada de EBV) y transfectante de 721.221 CEA. Se generaron

las proteínas de fusión NCR1 - Ig, NKp46 - Ig, NCR1 - T, NKG2D - Ig, CEA - Ig y NKp46D1 - Ig en células COS - 7 y se purificaron en una columna de proteína G, como se describe (28).

- 5 [0102] Tinción inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia. Se prepararon secciones embebidas en parafina de tejidos pancreáticos de la autopsia de humanos no diabéticos, de embriones de ratones NOD (E20), y de ratones NOD hembra de 1 - 14 semanas de edad y de ratones BALB / c de 8 – 12 semanas. Después de la recuperación de antígenos, las secciones se incubaron con las proteínas de fusión de Ig durante dos horas. Las secciones se incubaron con anticuerpo antihumano políclonal de conejo marcado con biotina (Jackson ImmunoResearch), dirigido contra la porción Fc gamma de las proteínas de fusión. Para la tinción inmunohistoquímica, los portaobjetos se incubaron durante 30 min con un polímero marcado con peroxidasa de rábano picante conjugada con anticonejo (EnVision™; Dako) seguido de incubación (1 - 3 min) con sustrato de 3, 3' diaminobencidina, y la contratinación con hematoxilina.
- 10 [0103] Para la tinción de inmunofluorescencia, además de la incubación con proteínas de fusión, se incubaron también secciones de tejidos con insulina políclonal antiratón (DakoCytomation); anticuerpo humano antiratón antisomatostatina (Beta Cell Biology Consorcio) y antiglucagón de conejo y anticuerpos contra la insulina, somatostatina y glucagón (Beta Consorcio de Biología Celular), seguido de incubación con la siguiente mezcla de tres anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo: anticonejillo de indias conjugado con indocarbocianina; - antiratón conjugado con carbocianina y anticonejo conjugado con indodicarbocianina (todo de Jackson ImmunoResearch). Como control, las muestras se tiñeron con la proteína de fusión de cada uno y todos los reactivos (anticuerpos primarios y secundarios) individualmente. Tanto para la inmunohistoquímica como para la tinción de inmunofluorescencia, se utilizó una proteína de fusión NKp46 - Ig que contiene sólo el dominio de unión a D2 y la región del tallo de NKp46.
- 15 [0104] Aislamiento de células beta; ensayo de movilización del indicador de ensayo BW y CD107a: Se prepararon islotes pancreáticos de ratones normales y NOD utilizando una solución de colagenasa XI (Sigma) diluida en solución salina equilibrada de Hank (Biological Industries Kibbutz Beit Haemek) a una concentración de 1 mg / ml. La solución se inyectó primero en el conducto pancreático antes de extraer el páncreas, seguido por la digestión a 37 ° C durante 15 - 23 min. Se seleccionaron islotes individuales a mano bajo un microscopio y luego se separaron en una solución de una sola célula.
- 20 [0105] El ensayo para el análisis de la superficie de la célula movilizada CD107a se ha descrito previamente (31). En algunos experimentos las células NK se preincubaron durante una hora con sueros derivados de una piscina de cada grupo de ratones tratados, diluida hasta un título de 1: 10.000.
- 25 [0106] Para la medición de CD107a *in vivo*, las células NK derivadas de los islotes de células beta se tiñeron para la expresión CD107a. Para la tinción de citometría de flujo, las células beta se tiñeron con 1 mg de GLUT - 2 conjugado con biotina antiratón (R & D Systems) y con 5 µg de proteínas de fusión. Se han descrito (29) la generación y el uso de células que expresan BW NKp46 fusionadas a los dominios transmembrana y de cola de la cadena ζ de ratón CD3 (BW NKp46 - ζ).
- 30 [0107] Diabetes inducida por estreptozotocina. Para el modelo de LDST múltiple, se inyectó estreptozotocina (Sigma) disuelta en tampón de citrato, pH 4,5, a una concentración de 50 mg / kg a 10 - 12 ratones emparejados por sexo y edad de 8 - 10 semanas por vía intraperitoneal durante 5 días consecutivos con. El día 0 se definió como el primer día de la inyección de estreptozotocina. Las concentraciones de glucosa en sangre se midieron en el día 7 y hasta 45 días después de la primera inyección utilizando un glucómetro (Accu - Chek®, Roche ® Diagnostics). El análisis estadístico de múltiples LDST se realizó mediante el análisis de Kaplan - Meier con la prueba de logrank para comparar curvas de supervivencia de los dos grupos de ratones, y mediante análisis de la varianza con un modelo de medidas repetidas para la evaluación de los efectos del tiempo, el efecto de grupo y la interacción entre el tiempo y el grupo durante el desarrollo de la diabetes.
- 35 [0108] Ensayo de citometría de flujo de anticuerpos y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Antes del aislamiento de linfocitos de páncreas, se retiraron los ganglios linfáticos pancreáticos para evitar la contaminación de linfocitos. A continuación, los tejidos pancreáticos se cortaron en piezas de 1 mm³ y se digirieron con 1,5 mg de ADNasa tipo I y 15 mg de colagenasa tipo IV (Sigma). Los sobrendantes se pasaron a través de un filtro de células de 40 micras y se cargaron en un gradiente de densidad de Ficoll para purificar la población de linfocitos. Se obtuvo sangre periférica de la vena de la cola. Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para CD16 y CD32 (93, BioLegend ®) para bloquear los receptores Fc antes de la tinción. Las células NK derivadas de ratones NOD se detectaron por tinción con anticuerpo políclonal de cabra conjugado con fitoeritrina de ratón NCR-1 y NKp46 (R & D Systems). Para la tinción de las células BW transfectadas con / NKp46, NKp30 o NKp44, 721.221 células, y 721.221 células transfectadas con CEA anticuerpos específicos a NKp46 (BioLegend ®), NKp30 (BioLegend ®), se utilizaron NKp44 (R & D Systems), y CEA (BioLegend ®). Para la tinción de las células transfectadas con NCR BW - 1, se utilizó anticuerpo políclonal de cabra conjugado con fitoeritrina a NCR - 1 y NKp46 (R & D Systems). Para la medición de la secreción de IL - 2 de ratón a partir de los transfectantes BW o IFN - y a partir de células NK de ratón, se utilizó una enzima estándar de ensayo de inmunoabsorción ligado con pares de anticuerpos de ratón a la IL - 2 (BioLegend ®) o IFN - y (BD Pharmingen).

Ejemplo 1. Células beta pancreáticas que expresan ligando (s) para NKp46.

[0109] Como NKp46 es la única NCR que se expresa en los ratones, se investigó su participación en modelos murinos para DT1. Debido a que los ligandos celulares para NKp46 y su ortólogo de ratón NCR - 1 son actualmente desconocidos, probamos si NKp46 y NCR - 1 reconocerían ligando (s) en las células beta del páncreas utilizando proteínas de fusión de NKp46 y NCR - 1 con inmunoglobulina (NKp46 - Ig y NCR1 - Ig, respectivamente; 23, 29). Como controles negativos se utilizaron la proteína de fusión NKp46D1 - Ig, correspondiente a la porción extracelular truncada de NKp46, que carece del dominio de unión al ligando (28), y otra proteína de fusión irrelevante que contiene la proteína de antígeno carcinoembrionario (CEA - Ig). Como control positivo se utilizó la proteína de fusión NKG2D - Ig.

[0110] Las células beta aisladas de ratones hembra BALB / c, C57BL / 6 y NOD fueron doblemente teñidas con el anticuerpo de ratón a GLUT - 2 (que marca específicamente las células beta) y las diversas proteínas de fusión de inmunoglobulina. Las células beta derivadas de todas las cepas ensayadas murinas fueron reconocidos por las proteínas de fusión NCR - 1 - Ig y NKp46 - Ig del ratón y, tal como se esperaba debido a la especificidad de especie, la unión más eficiente se observó con el ratón NCR1 - Ig (Figs. 1A y 1B). El etiquetado de las células beta con NKp46 - Ig y NCR - 1 - Ig fue específico, ya que no se observó tinción significativa alguna con la proteína de fusión de control de CEA - Ig (Figs. 1A y 1B, de control FP), ni con NKp46 - D1 - Ig. Según los resultados previos que demuestran que la NKG2D de las células T CD8 + está implicada en el reconocimiento de las células beta (22, 25), las células beta fueron reconocidas por NKG2D - Ig (Figs. 1A y 1B). Sin embargo, de manera interesante, no todas las células beta expresaron ligandos de NKG2D y se observó la expresión más alta de ligandos de NKG2D en las células beta NOD (21 %, 11 %, y 47 %, para BALB / c, C57BL / 6 y NOD respectivamente; la Fig 1B). Además, la expresión de los ligandos de NKG2D se redujo significativamente durante la progresión de la diabetes (47 % en ratones NOD de 8 semanas, en comparación con un 13 % en ratones de 14 semanas de edad, Fig. 1B).

[0111] Es importante destacar que, la mayor parte de las células beta derivadas de todas las cepas de ratones fueron reconocidas por la proteína de fusión NCR1 - Ig (Fig. 1A). En las células beta derivadas de ratones C57BL / 6, la intensidad de la tinción NCR1 - Ig se redujo ligeramente (Fig. 1B) en comparación con las otras cepas, y en contraste con la expresión del ligando NKG2D, la expresión del ligando NCR1 era constante durante el desarrollo de la diabetes (Fig. 1B). En este sentido, podían distinguirse cuatro subpoblaciones de células beta (Fig. 1C y Fig. 1D). La subpoblación G1 que comprendía la mayor parte de las células beta es positiva para GLUT - 2 y expresa niveles moderados de ligando NCR - 1. Las subpoblaciones G2 y G4 son positivas para GLUT - 2 (niveles bajos en G4) y expresan altos (G2) o baja (G4) niveles de ligando para NCR - 1. La subpoblación G3 es positiva para GLUT - 2, y negativo para el ligando NCR - 1.

[0112] Para confirmar aún más que NKp46 reconoce ligandos específicos de células beta, se utilizó un ensayo de indicador de BW generado previamente (29). En este sistema de la porción extracelular de NKp46 está fusionada a los dominios transmembrana y de la cola de la cadena ζ de ratón CD3 (NK - P46 - CD3; Fig. 2A) y, por lo tanto, el reconocimiento del ligando conduce a la secreción de IL - 2 de ratón. Se observó la secreción sustancial de la IL - 2 en células BW NK - P46 - CD3 transfectadas incubadas con células beta derivadas de todas las cepas de ratón (Fig. 2B). Se observaron niveles muy bajos de IL - 2 en la secreción de células BW parentales incubadas con las células beta, y en células BW NK - P46 - CD3 transfectadas incubadas con las células HeLa (Figura 2B), las células derivadas de tejido exocrino de páncreas o linfocitos de sangre periférica.

[0113] Para demostrar que también existen ligandos para NKp46 sobre las células beta humanas y que la tinción específica se puede observar en el tejido endocrino de todo el páncreas, se realizó la tinción inmunohistoquímica. Se observó una intensa tinción NKp46 - Ig de las células beta en los islotes de tejidos pancreáticos derivados de humanos, ratones NOD hembra, y ratones BALB / c (Fig. 3A). En los ratones NOD hembra, la insulitis observada se manifiesta por la infiltración de células mononucleares, y las células de los islotes pancreáticos residuales se tiñeron con NKp46 - Ig.

[0114] Para investigar la importancia del ligando NKp46 en la patogénesis de la diabetes tipo 1, se realizó la tinción inmunohistoquímica de los islotes NOD antes y después del desarrollo de la insulitis, incluyendo el período embrionario. No se detectaron ligandos NKp46 en los islotes de embriones (E20, Fig. 3B). Sin embargo, los ligandos de NKp46 aparecieron gradualmente en la etapa posnatal, y estaban presentes antes del desarrollo de la insulitis (semana 2), y a lo largo de la progresión de la insulitis (semanas 6 y 14; Fig. 3B). La insulitis en DM1 de ratones NOD se acompaña de sialitis autoinmune, y los ligandos NKp46 se expresaron en las glándulas salivales de ratones NOD hembra y BALB / c (Fig. 3C). En los ratones NOD, se ve la infiltración salival de células mononucleares de la glándula (flechas, Fig. 3C). Otros tejidos examinados en ratones NOD hembra y BALB / c (de pulmón, músculo, hígado, bazo, tiroides) no se reconocieron mediante NKp46 - Ig (Fig. 3D).

[0115] Para apoyar la observación de que el ligando para NKp46 en el tejido pancreático se expresa específicamente en las células beta productoras de insulina y no en otras células de los islotes (por ejemplo, glucagón o células productoras de somatostatina), se realizó la tinción de inmunofluorescencia doble y triple de tejido pancreático derivado de ratones BALB / c (Fig. 3E), NOD (Fig. 3F) y humano (Figura 3G). Como se muestra en

las Figs. 3E - G, se produjo un solapamiento sustancial de tinción con NKp46 - Ig y antiinsulina, lo que indica que NKp46 tiñe únicamente células beta. La tinción era específica, ya que no se observó tinción con la proteína de fusión de control NKp46D1 - Ig (Figs. 3E - G; control FP), o CEA - Ig, y no hubo coincidencia para la tinción con antisomatostatina o antiglucagón y reconocimiento de NKp46 - Ig (Fig. 3H). Otros tejidos normales examinados, como el tiroides humano y el bazo no se reconocieron mediante NKp46 - Ig (Fig. 3I). Tomados en conjunto, los cuatro métodos diferentes usados indican que un ligando específico para NKp46 se expresa en las células beta en humanos y ratones.

Ejemplo 2. Las células beta inducen la degranulación de las células NK de manera dependiente de NKp46.

[0116] Las dos funciones principales de las células NK son la citotoxicidad directa y la secreción de citoquinas, incluyendo el interferón - γ (IFN - γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Nuestro siguiente objetivo era, por tanto, determinar si NKp46 podría activarse por las células beta. Para probar la inducción de la secreción de citoquinas se utilizaron células NK obtenidas a partir de ratones knockout NCR - 1 GFP/GFP y de ratones heterocigóticos NCR - 1 $^{+/GFP}$ (23). En estos ratones knockout, una proteína fluorescente verde de codificación de gen indicador (GFP) se inserta en el locus de NCR - 1 y por lo tanto se elimina el gen NKp46, y todas las células NK se marcan de verde. Los ratones heterocigóticos NCR - 1 $^{+/GFP}$ son normales y muestran funciones similares a la de ratones de tipo salvaje (23).

[0117] Para ensayar la secreción de citoquinas a partir de células NK, se aislaron células NK que expresan GFP a partir de los esplenocitos de NCR - 1 $^{+/GFP}$ y de ratones NCR - 1 $^{+/GFP}$ y se incubaron junto con las células beta derivadas de ratones NOD, BALB / c y C57BL / 6. Ni el IFN - γ (Fig. 4A) ni el TNF se secretan, con independencia de expresión de NCR - 1. Sin embargo, las células NK NCR - 1 GFP/GFP secretaron menos IFN - γ y de lo que lo hicieron las células NCR - 1 $^{+/GFP}$ cuando se incubaron junto con una línea celular de rabdomiosarcoma de ratón (RMS). Por lo tanto, se concluyó que la interacción de NKp46 con su ligando (s) sobre las células beta no conduce a la secreción de citoquinas.

[0118] A continuación se examinó la degranulación de NK (indicando la movilización de CD107a en la superficie celular; Refs 30, 31.) en lugar de la citotoxicidad directa, porque las células beta del ratón casi no proliferan y por lo tanto es casi imposible marcarlas con isótopos radiactivos. Las células NK obtenidas de los bazos de ratones NCR - 1 $^{+/GFP}$ y NCR - 1 GFP/GFP se incubaron con las células beta derivadas de ratones BALB / c y NOD. Significativamente, se observó menos degranulación en el NCR - 1 GFP/GFP se incubaron con las células beta derivadas de cada cepa de ratón (Fig. 4B). Por el contrario, en las células NK, NCR - 1 $^{+/GFP}$ y NCR - 1 GFP/GFP mostraron degranulación similar en respuesta a las células YAC - 1, que son destruidas de manera independiente de NCR1 (23), y se observó un mínimo de degranulación de las células NK con el control negativo de HeLa (Fig. 4B).

[0119] Por último, se analizó el estado de la degranulación *in vivo* de las células NK pancreáticas patógenas, que están presentes en los islotes de ratones NOD durante el desarrollo de la diabetes. Se aislaron las células NK de los ganglios linfáticos pancreáticos y de islotes de células beta de los ratones NOD hembra prediabéticos (12 semanas de edad) y se tiñeron para la expresión CD107a. Se observó degranulación sustancial de las células de islotes pancreáticos NK patógenos, mientras que se encontró poca o ninguna degranulación en las células NK en los nódulos linfáticos del páncreas (Fig. 4C). Según los resultados anteriores, no se observó secreción de IFN - γ a partir de las células NK pancreáticas patógenas. Por lo tanto, las células NK patógenas presentes *in vivo* en los islotes pancreáticos se habían degranulado.

Ejemplo 3. Desarrollo de la diabetes alterada en ausencia de NCR - 1

[0120] Nuestro siguiente objetivo fue poner a prueba la función de NKp46 en el desarrollo de la diabetes *in vivo*. A ratones knockout y emparejados por sexo y edad NCR - 1 GFP/GFP y ratones heterocigotos NCR - 1 $^{+/GFP}$ se les inyectó estreptozotocina por vía intraperitoneal durante 5 días consecutivos, y se midieron las concentraciones de glucosa en sangre desde el día 7 de la inyección y hasta 45 días después. En ausencia de NCR - 1, el desarrollo de la diabetes se vio afectada significativamente ($p = 0,008$, análisis de Kaplan - Meier con la prueba de logrank; Fig. 5A). Además, con el fin de evaluar el efecto de la ausencia de NKp46 en la gravedad de la diabetes, se examinaron los niveles medios de glucosa en sangre en los ratones que habían desarrollado la diabetes. La hiperglucemia, definida como los niveles de glucosa en sangre sin ayuno > 250 mg / dl en dos mediciones consecutivas, fue menos severa en ratones diabéticos NCR - 1 GFP/GFP (Fig. 5B, $p < 0,001$, modelo ANOVA).

[0121] El efecto "protector" en los ratones knockout NCR - 1 se asoció con una disminución de la insulitis, según se determina usando una escala insulitis patológica publicada (32). Según esta escala, la insulitis se calcula como el porcentaje de islotes por ratón en cada etapa de la insulitis (0 - sin infiltración; 1 - infiltración menor; 2 - periinsulitis menor; 3 - periinsulitis clara; 4 - insulitis con invasión intraislete por células mononucleares). En los ratones de tipo salvaje, se observaron las 4 etapas y alrededor del 6 % de los islotes mostraron insulitis en fase 4, mientras que en los ratones knockout, alrededor del 45 % de los islotes no tenía ninguna infiltración (en comparación con menos del 30 % en ratones de tipo salvaje) y no se observó la insulitis en fase 4 (Fig. 5C). Estos resultados indican que NKp46 es importante para el desarrollo de la diabetes y la destrucción de los islotes en el modelo LDST.

Ejemplo 4. Aparición de células NK en el páncreas durante el desarrollo de la diabetes

[0122] Mientras NKp46 se expresa en las células beta normales, la diabetes no se desarrolla en cada individuo. Una hipótesis para explicar este hecho es que las células NK y T que normalmente no se encuentran en el páncreas aparecen en este órgano durante el desarrollo de la diabetes. Para probar esta hipótesis, se controló la aparición de células NK en los tejidos pancreáticos en dos modelos murinos de DT1.

[0123] Se siguieron las células NK durante el período embrionario (E20), preinsulitis (3 - 4 semanas), insulitis temprana (6 - 8 semanas), prediabetes (12 - 14 semanas, ratones con niveles de glucosa normal en ayunas, pero la prueba de tolerancia a la glucosa patológica intraperitoneal), y la etapa de la diabetes tardía (2 - 3 semanas después del diagnóstico de la diabetes). El porcentaje más alto (en torno al 4 %) de las células NK que expresan NCR - 1 en el páncreas se encontraba en la etapa de prediabética (Figs. 6A y 6B). En la fase tardía del desarrollo de la diabetes, el porcentaje de células NK se redujo significativamente (alrededor del 0,7 %). También se controló la aparición de las células NK (por la expresión de GFP) en los tejidos pancreáticos de inyectados en ratones knockout con LDST NCR - 1^{GFP/GFP}, durante el período embrionario (E20), preinsulitis (día 0; día de la inyección LDST), a principios de insulitis (7 días después de la inyección LDST), prediabetes (día 9 después de la inyección LDST) y diabetes manifiesta tarde (día 45 después de la inyección LDST). Se observaron la mayoría de las células NK del páncreas en la etapa de prediabético, el día 9 después de la inyección, el mismo día en el que, por lo general, comienza la transición de la insulitis a la diabetes en este modelo (Figs. 5B y 6). Las pocas células NK observadas en el período embrionario y en la etapa de preinsulitis en ambos modelos contaminaron, probablemente, linfocitos.

[0124] Mediante el control de las células positivas para CD3 también se pudo seguir la aparición de células T en el páncreas y se encontró que de manera similar a las células NK, las células T no se encuentran normalmente en el páncreas y aparecen en el páncreas de forma concomitante con las células NK. Por lo tanto, en condiciones normales, a pesar del hecho de que las células beta del páncreas tanto de ratones como de humanos expresan ligandos para NKp46, la diabetes no se desarrolla probablemente porque las células NK y células T están ausentes en el páncreas.

Ejemplo 5. Las proteínas NKp46 previenen el desarrollo de la diabetes cuando se inyecta a tiempo.

[0125] Nuestro siguiente objetivo fue demostrar que NKp46 sí está implicada en el desarrollo de la diabetes en el ratón NOD modelo y en paralelo, para desarrollar una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de la diabetes tipo 1. Se demostró que el tratamiento de ratones NOD con anticuerpos monoclonales antiNKG2D sin deplecionar atenúa el desarrollo de la diabetes afectando la función de las células T CD8 + autorreactivas (25). Sin embargo, no se encuentra disponible ningún anticuerpo bloqueante o deplecionado dirigido contra el receptor NKp46 murino. Sin embargo, hemos tenido éxito en la inducción de anticuerpos específicos antiNKp46 en ratones NOD por inyecciones repetidas de la proteína de fusión NKp46 - Ig. Utilizamos NKp46 - Ig y NCR1 - Ig, y, para evitar la unión no específica, también se utilizó una versión adicional del receptor murino NCR - 1 que carece de sitios de unión al complemento y sitios de unión (NCR1 - t).

[0126] Se inyectó a ratones hembra NOD ($n = 8 - 9$) las diversas proteínas de fusión por vía intraperitoneal a una dosis de 0,005 g por kg de peso corporal, o PBS dos veces a la semana, a partir de las 6 semanas de edad. Los ratones tratados con PBS solo comenzaron a desarrollar la diabetes a las 10 semanas de edad y el 67 % eran diabéticos a las 24 semanas, y en ese momento, se interrumpió el tratamiento (Fig. 7). Sorprendentemente, la diabetes no se observó en ninguno de los ratones NOD tratados con NKp46 durante las primeras 19 semanas de tratamiento. Además, la mayoría de los ratones NOD tratados con proteína de fusión se mantuvo viva y sin enfermedad hasta las 36 semanas de edad. Sin embargo, el 89 % de los ratones tratados con PBS se convirtieron en diabéticos y la mayoría de ellos murieron antes de las 33 semanas de edad (Fig. 7). Esta diferencia entre los grupos fue estadísticamente significativa ($p = 0,000015$, análisis de Kaplan - Meyer con la prueba de logrank).

[0127] La tinción con hematoxilina y eosina de tejido pancreático derivado de todos los ratones tratados con la proteína de fusión mostró muchos islotes residuales con, en general, sólo insulitis leve, una situación similar a la del tejido pancreático derivado de ratones NOD hembras sanas y no tratados de 30 semanas de edad. Sin embargo, no se detectaron islotes pancreáticos en los ratones inyectados con PBS. No se observaron efectos secundarios en los ratones tratados, ya sea mediante examen macroscópico o análisis histológico.

[0128] Para investigar el mecanismo responsable del efecto protector mediado por las proteínas de fusión NKp46, se recogieron los sueros de los diferentes grupos de ratones durante el curso del experimento. La inyección de las distintas variantes NKp46 - Ig dio como resultado la generación de anticuerpos específicos dirigidos contra NKp46 y NCR - 1, pero la inyección de PBS no lo hizo. Los anticuerpo antiNKp46 y anti NCR - 1 fueron principalmente del isótipo IgM, y estuvieron presentes en el suero a partir de las 2 y 4 semanas, respectivamente, tras la inyección de la proteína de fusión, y se mantuvieron en el suero durante un máximo de 36 semanas de edad (al final del experimento).

[0129] Para obtener información sobre el mecanismo por el cual las proteínas solubles de fusión NKp46 inhibieron el desarrollo de la diabetes, lo primero que se excluyó fue la posibilidad de que estas proteínas de fusión actuaran

mediante la depleción de las células NK o por la supresión de la aparición de las células NK en el páncreas, señalando que se ha encontrado un porcentaje similar de las células NK en la sangre periférica y en los tejidos pancreáticos de los grupos de ratones tratados con PBS y con proteína de fusión. La observación de que los porcentajes de células NK en los tejidos pancreáticos de los ratones tratados NKp46 - Ig sanos no se alteraron después de los diversos tratamientos contrasta con la reducción del porcentaje de células T CD8 + en los páncreas sanos de los ratones tratados con un anticuerpo antiNKG2D (25). Además, el ligando NKp46 desconocido se expresó en niveles similares en las células beta derivadas de los ratones tratados proteína de fusión y el grupo PBS. La participación potencial de la porción Fc también se descartó porque la versión truncada de la proteína de fusión, que carece de dominio de unión al complemento y de unión a FC, era casi tan eficaz como las otras proteínas de fusión suprimiendo la diabetes (Fig. 7).

[0130] Para probar si los anticuerpos anti NKp46 / NCR - 1 generados durante la inyección de proteína de fusión podían bloquear la degranulación de las células NK, se cultivaron células NK derivadas de los bazo de ratones NOD hembra no diabéticos de 8 semanas de edad con las células beta obtenidas a partir de ratones NOD hembra prediabéticos y realizaron el ensayo de movilización CD107a. La Figura 8A muestra que la desgranulación de las células NK se redujo significativamente ($p < 0,05$) después de la preincubación con suero derivado de ratones tratados con las proteínas de fusión NKp46, mientras que los sueros normal o sueros derivados de los ratones tratados con PBS no alteraron la degranulación de NK ($p = 0,3$, la Fig. 8A).

[0131] Como la inyección de anticuerpos antiNKG2D, o un ligando NKG2D soluble, induce la internalización del receptor NKG2D (22, 34), se determinó si el receptor de NCR - 1 también era regulado a la baja debido a la generación de anticuerpos específicos NKp46 en la proteína de fusión tratada ratones. Se observó una reducción significativa en la expresión del receptor de NCR - 1 en las células NK derivadas de ratones tratados con las proteínas de fusión en comparación con los ratones tratados con PBS (Fig. 8B). La reducción de NCR - 1 fue sistémica, como la reducción similar observada en las células NK derivadas de la sangre o el páncreas. La tinción con anti - IgG de ratón fue similar en las células NK de los grupos PBS y los tratados con proteínas de fusión, lo que indica que las células NK no fueron simplemente recubiertas con los anticuerpos antiratón NKp46.

[0132] Nuestro siguiente objetivo fue determinar si la regulación a la baja de NKp46 afectaría a la degranulación de las células NK obtenidas a partir de los grupos de ratones tratados. Para este propósito, se aislaron las células NK a partir de esplenocitos de ratones 36 semanas de edad y en este punto, 12 semanas después del final de la terapia, la ratones tratados con PBS ya eran diabéticos. En los ratones diabéticos tratados con PBS, se observó una degranulación baja pero todavía significativa de las células NK, mientras que las células NK derivadas de varios grupos sanos tratados con NKp46 no se degranularon tras la interacción con las células beta ($p < 0,001$, Fig. 8C). La relativamente baja función de las células NK derivadas del grupo tratado con PBS en comparación con los ratones de control sanos de 8 semanas de edad (Fig. 8A), podría ser debido al efecto de la hiperglucemia.

[0133] Por último, para demostrar que el deterioro en la actividad de las células NK era específico para el receptor de NKp46, se investigó la capacidad de la degranulación de células NK derivadas de ratones tratados con proteínas de fusión o PBS después de la incubación con las células diana dependientes de NKp46 (como PD1. 6 y RMAS; Refs 23, 35), o células diana independientes de NKp46, dependientes de NKG2D (como YAC - 1; Ref. 23). Todas las células diana cuya muerte es dependiente de NKp46 indujeron una expresión mínima de CD107a en las células NK derivadas de las diversas proteínas de fusión NKp46, mientras se observó una expresión sustancial de CD107a con las células NK derivadas de los ratones tratados con PBS. En contraste, las células NK derivadas de todos los grupos expresaron CD107a después de la incubación con células YAC - 1 ($p = 0,38$, Fig. 8D). Estos resultados indican que la falta de citotoxicidad de células NK se restringe principalmente al receptor de NKp46 y que el principal mecanismo de la disfunción NKp46 es la regulación a la baja del receptor. Por lo tanto, NKp46 es crucial para el desarrollo de la diabetes y en la ausencia de NKp46 o cuando se deteriora la función de NKp46, la diabetes, en la mayoría de los casos, se evita.

Ejemplo 6. La administración *in vivo* de proteínas de fusión NKp46 a ratones NOD hembra en la etapa prediabética tipo 1 previene el desarrollo de diabetes.

[0134] Para investigar si nuestra modalidad de tratamiento puede prevenir o retrasar la aparición de diabetes en la etapa tardía de prediabetes y para demostrar que la inyección de la proteína de fusión de Ig no dio lugar a un efecto no específico, se injectó a ratones NOD hembra no diabéticos de 11 - 12 semanas de edad PBS, NKp46 - Ig, NCR - 1 - Ig o la proteína de fusión irrelevante CEA - Ig. Como era de esperar, todos los ratones desarrollaron anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína de fusión inyectada, incluyendo el control de CEA - Ig. Se detectaron los anticuerpos antiNCR - 1 en el suero alrededor de 4 semanas después de la primera inyección (probablemente porque la tolerancia tenía que rota) y en la proteína de fusión de otros grupos de anticuerpos específicos que se detectaron ya 2 semanas después de la inyección. La mayoría de los anticuerpos generados en todos los grupos de ratones inyectados fueron del isotipo IgM.

[0135] Se inyectaron a ratones NOD las diversas proteínas de fusión o PBS, a partir de 11 - 12 semanas de edad y hasta las 20 semanas de edad. El diagnóstico de la diabetes, el plan y la dosis de la inyección de proteína de fusión fueron los mismos que en el experimento de inyección temprana (Figura 7). CEA - Ig no impidió el desarrollo

de la diabetes e incluso causó una ligera aceleración de la enfermedad en comparación con el grupo tratado con PBS (Fig. 9A). Sin embargo, el 67 % de los ratones tratados con NCR - 1 - Ig, y todos los ratones tratados con NKp46 - Ig permanecieron sin diabetes hasta 20 semanas de edad y durante las primeras 6 semanas después de detener la terapia (Fig. 9A). La diferencia entre los grupos fue estadísticamente significativa ($p = 0,001$, análisis de Kaplan - Meier con la prueba de logrank). La generación de anticuerpos dio lugar a una específica regulación a la baja de NCR - 1 (Fig. 9B) que se observó 2 y 4 semanas después de las inyecciones de NKp46 - Ig y NCR - 1 - Ig, respectivamente. El tratamiento de NCR - 1 - Ig fue menos eficiente en comparación con el tratamiento con NKp46 - Ig probablemente porque se observaron los anticuerpos antiNCR - 1 sólo alrededor de 4 semanas después de la inyección inicial. Por último, para comprobar si la baja regulación de NCR - 1 se traduciría en una reducción de la degranulación de células NK *in vivo*, se obtuvieron células NK pancreáticas patógenas derivadas de los islotes de cada uno de los grupos de ratones tratados y se tiñeron para expresar CD107a. Como puede verse en la Fig. 9C, mientras que alrededor del 30 % de las células NK pancreáticas patógenas derivadas de las células beta del CEA - Ig, o de grupos tratados con PBS expresaron CD107a, en los grupos tratados con NKp46 y NCR - 1, menos del 15% de las células NK tenía una expresión sustancial de CD107a.

[0136] Tomados en conjunto, estos hallazgos indican que NKp46 es crítica para el desarrollo de la diabetes y que la terapia con NKp46 podría utilizarse para prevenir el desarrollo de diabetes en la etapa de prediabetes tarde, cuando las células beta se enfrentan a la destrucción inmediata por las células NK.

20 Referencias

[0137]

1. Delovitch, T.L. & Singh, B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7, 727 - 738 (1997).
2. Kikutani, H. & Makino, S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* 51, 285 - 322 (1992).
3. Like, A.A. & Rossini, A.A. Streptozotocin-induced pancreatic insulitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193, 415 - 417 (1976).
4. O'Brien, B.A., Harmon, B.V., Cameron, D.P. & Allan, D.J. Beta - cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol* 178, 176 - 181 (1996).
5. Paik, S.G., Fleischer, N. & Shin, S.I. Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 6129 - 6133 (1980).
6. Hutchings, P. et al. Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages. *Nature* 348, 639 - 642 (1990).
7. Miyazaki, A. et al. Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre - diabetic non - obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study. *Clin Exp Immunol* 60, 622 - 630 (1985).
8. Dotta, F. et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulitis in recent -onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5115 - 5120 (2007).
9. Rodacki, M. et al. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 56, 177 - 185 (2007).
10. Poirot, L., Benoist, C. & Mathis, D. Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8102 - 8107 (2004).
11. Alba, A. et al. Natural killer cells are required for accelerated type 1 diabetes driven by interferon-beta. *Clin Exp Immunol* 151, 467 - 475 (2008).
12. Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M.C., Biassoni, R. & Moretta, L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 3, 6 - 8 (2002).
13. Hanna, J. et al. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *J Clin Invest* 114, 1612 - 1623 (2004).
14. Long, E.O. Tumor cell recognition by natural killer cells. *Semin Cancer Biol* 12, 57 - 61 (2002).
15. Karre, K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55, 221 - 228 (2002).
16. Lanier, L.L. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23, 225 - 274 (2005).
17. Raulet, D.H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3, 781 - 790 (2003).
18. Flodstrom, M., Shi, F.D., Sarvetnick, N. & Ljunggren, H.G. The natural killer cell -- friend or foe in autoimmune disease? *Scand J Immunol* 55, 432 - 441 (2002).
19. Hansson, M., Kiessling, R. & Andersson, B. Human fetal thymus and bone marrow contain target cells for natural killer cells. *Eur J Immunol* 11, 8 - 12 (1981).
20. Nakamura, N. et al. Intrinsic cytotoxicity of natural killer cells to pancreatic islets in vitro. *Diabetes* 39, 836 - 843 (1990).
21. Morse, R.H., Seguin, R., McCrea, E.L. & Antel, J.P. NK cell-mediated lysis of autologous human oligodendrocytes. *J Neuroimmunol* 116, 107 - 115 (2001).
22. Ogasawara, K. et al. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 18, 41 - 51 (2003).
23. Gazit, R. et al. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1. *Nat Immunol* 7, 517 - 523 (2006).

24. Moretta, L. Lymphocyte effector mechanisms in innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 17, 303 - 305 (2005).
25. Ogasawara, K. et al. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* 20, 757 - 767 (2004).
- 5 26. Maier, L.M. et al. NKG2D-RAE-1 receptor-ligand variation does not account for the NK cell defect in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 181, 7073 - 7080 (2008).
27. Arnon, T.I. et al. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31, 2680 - 2689 (2001).
- 10 28. Amon, T.I. et al. The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* 103, 664 - 672 (2004).
29. Mandelboim, O. et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055 - 1060 (2001).
30. Aktas, E., Kucuksezer, U.C., Bilgic, S., Erten, G. & Deniz, G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* 254, 149 - 154 (2009).
- 15 31. Alter, G., Malenfant, J.M. & Altfeld, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294, 15 - 22 (2004).
32. Flodstrom, M., Tyrberg, B., Eizirik, D.L. & Sandler, S. Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 48, 706 - 713 (1999).
- 20 33. Biassoni, R. et al. The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* 29, 1014 - 1020 (1999).
34. Lodoen, M. et al. NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med* 197, 1245 - 1253 (2003).
35. Halfteck, G.G. et al. Enhanced *in vivo* growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J Immunol* 182, 2221 - 2230 (2009).
- 25 36. Alba, A. et al. IFN beta accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to beta cells in nondiabetes-prone mice. *J Immunol* 173, 6667 - 6675 (2004).
37. Kitagawa, Y. et al. Islet cells but not thyrocytes are susceptible to lysis by NK cells. *J Autoimmun* 4, 703 - 716 (1991).
- 30 38. MacKay, P., Jacobson, J. & Rabinovitch, A. Spontaneous diabetes mellitus in the Bio-Breeding/Worcester rat. Evidence *in vitro* for natural killer cell lysis of islet cells. *J Clin Invest* 77, 916 - 924 (1986).
39. Foulis, A.K., McGill, M., Farquharson, M.A. & Hilton, D.A. A search for evidence of viral infection in pancreases of newly diagnosed patients with IDDM. *Diabetologia* 40, 53 - 61 (1997).
40. Horwitz, M.S. et al. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 4, 781 - 785 (1998).
- 35 41. Lodde, B.M. et al. NOD mouse model for Sjogren's syndrome: lack of longitudinal stability. *Oral Dis* 12, 566 - 572 (2006).
42. Gurr, W., Shaw, M., Li, Y. & Sherwin, R. RegII is a beta-cell protein and autoantigen in diabetes of NOD mice. *Diabetes* 56, 34 - 40 (2007).
43. Matsumoto, S. et al. Isolation of tissue progenitor cells from duct-ligated salivary glands of swine. *Cloning Stem Cells* 9, 176 - 190 (2007).
- 40 44. Baert, F. et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 348, 601 - 608 (2003).
- 45 45. Amon TI, Lev M, Katz G, Chemobrov Y, Porgador A, Mandelboim O. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol*. 2001;31: 2680 - 2689.
46. Amon TI, Achdout H, Lieberman N, Gazit R, Gonen-Gross T, Katz G, Bar-Ilan A, Bloushtain N, Lev M, Joseph A, Kedar E, Porgador A, Mandelboim O. The mechanisms controlling the recognition of tumor and virus infected cells by NKp46. *Blood*. 2004;103: 664 - 672.

LISTADO SECUENCIAL

50 [0138]

<110> Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem Ltd.
 Hadasit Medical Research Services and Development Ltd. Ben-Gurion University of the Negev Research and Development Authority

<120> USO DE NKp46 PARA PREVENIR LA DIABETES

<130> YISSUM 074 / PCT

60 <150> 61/202.629
 <151> 2009 - 03 - 19

65 <150> 61 / 259.340
 <151> 2009 - 11 - 09

<160> 35

<170> Patente en versión 3.5

5 <210> 1

<211> 134

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido

15 <400> 1

Tyr Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser
1 5 10 15

20 Gly Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met
20 25 30

25 Phe Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr
35 40 45

30 Gly Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His
50 55 60

35 Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser
65 70 75 80

40 Phe Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn
85 90 95

45 Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro Thr Phe Pro Ala Asp Thr Trp Gly
100 105 110

50 Thr Tyr Leu Leu Thr Thr Glu Thr Gly Leu Gln Lys Asp His Ala Leu
115 120 125

Trp Asp His Thr Ala Gln
130

55 <210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Péptido

<400> 2

65

	Tyr Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser
1	5 10 15
5	Gly Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met
	20 25 30
10	Phe Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr
	35 40 45
15	Gly Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His
	50 55 60
20	Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser
	65 70 75 80
25	Phe Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn
	85 90 95
30	Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro Thr Phe Pro Asp His Ala Leu Trp
	100 105 110
35	Asp His Thr Ala Gln 115
	<210> 3 <211> 134 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Péptido
45	<400> 3
50	
55	
60	
65	

ES 2 486 673 T3

ES 2 486 673 T3

Tyr Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser
 1 5 10 15

5 Gly Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met
 20 25 30

10 Phe Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr
 35 40 45

Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser
 65 70 75 80

15 Phe Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn
 85 90 95

20 Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro Thr Phe Pro Asp His Ala Leu Trp
 100 105 110

25 Asp His Thr Ala Gln
 115

<210> 5
 <211> 135
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido
 35 <400> 5

Arg Val Gly Glu Leu Trp Ser Glu Pro Ser Asn Leu Leu Asp Leu Val
 1 5 10 15

40 Val Thr Glu Met Tyr Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val His Pro Gly Pro
 20 25 30

45 Glu Val Ile Ser Gly Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys Arg Leu Asp Thr
 35 40 45

50 Ala Thr Ser Met Phe Leu Leu Lys Glu Gly Arg Ser Ser His Val
 50 55 60

Gln Arg Gly Tyr Gly Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro Leu Gly Pro Val
 65 70 75 80

55 Thr Thr Ala His Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Tyr Asn Asn
 85 90 95

60 His Ala Trp Ser Phe Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu Leu Val Thr Gly
 100 105 110

65 Asp Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro Thr Phe Pro Ala
 115 120 125

ES 2 486 673 T3

Asp Thr Trp Gly Thr Tyr Leu
130 135

<210> 6
<211> 40
<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial <220>

<223> Péptido
<400> 6

10 Glu Asn Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro Thr Phe Pro Ala Asp Thr
1 5 10 15

15 Trp Gly Thr Tyr Leu Leu Thr Thr Glu Thr Gly Leu Gln Lys Asp His
20 25 30

20 Ala Leu Trp Asp His Thr Ala Gln
35 40

<210> 7
<211> 23

25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Péptido
<400> 7

35 Phe Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr
1 5 10 15

40 Gly Lys Val Gln Ala Glu Phe
20

45 <210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

50 <223> Péptido
<400> 8

Phe Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr
1 5 10 15

55 Gly Lys Val Gln
20

60 <210> 9
<211> 142
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Péptido
<400> 9

ES 2 486 673 T3

Leu Lys Leu Val Val Thr Gly Leu Tyr Asp Thr Pro Asn Leu Trp Val
 1 5 10 15

5 Tyr Pro Arg Pro Glu Val Thr Leu Gly Glu Asn Val Thr Phe Phe Cys
 20 25 30

10 Gln Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Phe Leu Leu Lys Glu Arg Gly
 35 40 45

15 Ser Asn His Ile Gln Asn Lys Tyr Gly Asn Ile Gln Ala Glu Phe Pro
 50 55 60

20 Met Gly Pro Val Thr Arg Ala His Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly
 65 70 75 80

25 Ser Tyr Asn Asp Tyr Ala Trp Ser Phe Pro Ser Glu Pro Val Thr Leu
 85 90 95

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

35 Thr Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Glu Phe Asp Leu Ser Thr Asn Glu Ser
 115 120 125

40 Gly Leu Gln Lys Asp Ser Ala Phe Trp Asp His Thr Thr Gln
 130 135 140

45 <210> 10
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido
 <400> 10

55 Tyr Asp Thr Pro Asn Leu Trp Val Tyr Pro Gln Pro Glu Val Thr Leu
 1 5 10 15

60

65

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

5 Phe Phe Leu Leu Lys Glu Arg Gly Ser Asn His Ile Gln Asn Lys Tyr
 35 40 45

10 Gly Asn Ile Gln Ala Glu Phe Pro Met Gly Pro Val Thr Arg Ala His
 50 55 60

15 Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Tyr Asn Asp Tyr Ala Trp Ser
 65 70 75 80

20 Phe Pro Ser Glu Pro Val Thr Leu Leu Ile Thr Gly Gly Val Glu Asn
 85 90 95

25 Ser Ser Leu Ala Pro Thr Asp Pro Thr Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Glu
 100 105 110

30 Phe Asp Leu Ser Thr Asn Glu Ser Gly Leu Gln Lys Asp Ser Ala Phe
 115 120 125

35 Trp Asp His Thr Thr Gln
 130

40 <210> 11
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido
 <400> 11

50 Met Ser Ser Thr Leu Pro Ala Leu Leu Cys Val Gly Leu Cys Leu Ser
 1 5 10 15

55 Gln Arg Ile Ser Ala Gln Gln Gln Thr Leu Pro Lys Pro Phe Ile Trp
 20 25 30

60 Ala Glu Pro His Phe Met Val Pro Lys Glu Lys Gln Val Thr Ile Cys
 35 40 45

65 Cys Gln Gly Asn Tyr Gly Ala Val Glu Tyr Gln Leu His Phe Glu Gly
 50 55 60

ES 2 486 673 T3

Ser Leu Phe Ala Val Asp Arg Pro Pro Lys Pro Pro Glu Arg Ile Asn Lys
 65 70 75 80

5 Val Lys Phe Tyr Ile Pro Asp Met Asn Ser Arg Met Ala Gly Gln Tyr
 85 90 95

10 Ser Cys Ile Tyr Arg Val Gly Glu Leu Trp Ser Glu Pro Ser Asn Leu
 100 105 110

15 Leu Asp Leu Val Val Thr Glu Met Tyr Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val
 115 120 125

20 His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser Gly Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys
 130 135 140

25 Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met Phe Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg
 145 150 155 160

30 Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr Gly Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro
 165 170 175

35 Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly
 180 185 190

40 Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser Phe Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu
 195 200 205

45 Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro
 210 215 220

50 Thr Phe Pro Ala Asp Thr Trp Gly Thr Tyr Leu Leu Thr Thr Glu Thr
 225 230 235 240

55 Gly Leu Gln Lys Asp His Ala Leu Trp Asp His Thr Ala Gln Asn Leu
 245 250 255

60 Leu Arg Met Gly Leu Ala Phe Leu Val Leu Val Ala Leu Val Trp Phe
 260 265 270

65 Leu Val Glu Asp Trp Leu Ser Arg Lys Arg Thr Arg Glu Arg Ala Ser
 275 280 285

Arg Ala Ser Thr Trp Glu Gly Arg Arg Arg Leu Asn Thr Gln Thr Leu
 290 295 300

ES 2 486 673 T3

	Asp Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	305	310	315	320
	Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
5	325	330	335	
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
10	340	345	350	
	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
15	355	360	365	
	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
20	370	375	380	
	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
25	385	390	395	400
	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
30	405	410	415	
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
35	420	425	430	
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
40	435	440	445	
	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
45	450	455	460	
	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
50	465	470	475	480
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
55	485	490	495	
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
60	500	505	510	
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
65	515	520	525	
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	530	535		
	<210> 12			
	<211> 159			
	<212> PRT			

ES 2 486 673 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 12

5	Met Gly Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu 1 5 10 15
10	Leu Gly Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Arg Leu Arg Val Pro Tyr 20 25 30
15	Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser Gly 35 40 45
20	Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met Phe 50 55 60
25	Leu Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ser Ser Gln Val Gln Gln Gly Tyr Gly 65 70 75 80
30	Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His Arg 85 90 95
35	Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser Phe 100 105 110
40	Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn Thr 115 120 125
45	Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro Thr Phe Pro Asp Thr Trp Gly Thr Tyr 130 135 140
50	Leu Leu Thr Thr Glu Thr Gly Leu Gln Lys Asp His Ala Leu Trp 145 150 155
55	<210> 13 <211> 159 <212> PRT
60	<213> Secuencia <220> <223> Péptido <400> 13

ES 2 486 673 T3

	Met	Gly	Met	Pro	Met	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Thr	Leu	Tyr	Leu	
1					5					10					15		
5		Leu	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Ser	Cys	Leu	Gly	Arg	Leu	Arg	Val	Pro	Tyr
					20				25					30			
10		Asp	Thr	Pro	Thr	Leu	Ser	Val	His	Pro	Gly	Pro	Glu	Val	Ile	Ser	Gly
					35				40				45				
15		Glu	Lys	Val	Thr	Phe	Tyr	Cys	Arg	Leu	Asp	Thr	Ala	Thr	Ser	Met	Phe
					50			55				60					
20		Leu	Leu	Leu	Gln	Glu	Gly	Gln	Ser	Ser	Gln	Val	Gln	Gln	Gly	Tyr	Gly
					65			70			75			80			
25		Thr	Val	Gln	Ala	Glu	Phe	Pro	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Thr	Ala	His	Arg
					85				90				95				
30		Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Phe	Gly	Ser	Tyr	Asn	Asn	His	Ala	Trp	Ser	Phe
					100				105			110					
35		Pro	Ser	Glu	Pro	Val	Lys	Leu	Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Ile	Glu	Asn	Thr
					115				120			125					
40		Ser	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Pro	Asp	Thr	Trp	Gly	Thr	Tyr
					130			135				140					
45		<210>	14														
		<211>	159														
		<212>	PRT														
		<213>	Secuencia														
50		<220>															
		<223>	Péptido														
		<400>	14														
55																	
60																	
65																	

	Met	Gly	Met	Pro	Met	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Thr	Leu	Tyr	Leu
1					5					10						15
5	Leu	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Ser	Cys	Leu	Gly	Arg	Leu	Arg	Val	Pro	Tyr
					20					25						30
10	Asp	Thr	Pro	Ala	Leu	Ser	Val	His	Pro	Gly	Pro	Glu	Val	Ile	Ser	Gly
					35				40							45
15	Glu	Lys	Val	Thr	Phe	Tyr	Cys	Arg	Leu	Asp	Thr	Ala	Thr	Ser	Met	Phe
					50				55							60
20	Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Arg	Ser	Ser	His	Val	Gln	Arg	Gly	Tyr	Gly
				65				70				75				80
25	Lys	Val	Gln	Ala	Glu	Phe	Pro	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Thr	Ala	His	Arg
					85					90						95
30	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Phe	Gly	Ser	Tyr	Asn	Asn	His	Ala	Trp	Ser	Phe
					100				105							110
35	Pro	Ser	Glu	Pro	Val	Lys	Leu	Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Ile	Glu	Asn	Thr
					115				120							125
40	Ser	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Pro	Asp	Thr	Trp	Gly	Thr	Tyr
					130				135							140
45	<210>	15	<211>	159	<212>	PRT	<213>	Secuencia artificial								
50	<220>		<223>	Péptido	<400>	15										
55																
60																
65																

Met Gly Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu
 1 5 10 15

5 Leu Gly Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Arg Leu Arg Val Pro Tyr
 20 25 30

10 Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser Gly
 35 40 45

15 Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met Phe
 50 55 60

20 Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr Gly
 65 70 75 80

Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His Arg
 85 90 95

25 Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser Phe
 100 105 110

30 Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn Thr
 115 120 125

35 Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro Ala Phe Pro Asp Thr Trp Gly Thr Tyr
 130 135 140

40 Leu Leu Thr Thr Glu Thr Gly Leu Gln Lys Asp His Ala Leu Trp
 145 150 155

45 <210> 16
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido
 <400> 16

55

60

65

ES 2 486 673 T3

	Met	Gly	Met	Pro	Met	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Thr	Leu	Tyr	Leu
1					5						10					15
5	Leu	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Ser	Cys	Leu	Gly	Arg	Leu	Arg	Val	Pro	Tyr
					20					25					30	
10	Asp	Thr	Pro	Thr	Leu	Ser	Val	His	Pro	Gly	Pro	Glu	Val	Ile	Ser	Gly
					35				40				45			
15	Glu	Lys	Val	Thr	Phe	Tyr	Cys	Arg	Leu	Asp	Thr	Ala	Thr	Ser	Met	Phe
					50				55				60			
20	Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Arg	Ser	Ser	His	Val	Gln	Arg	Gly	Tyr	Gly
					65				70			75			80	
25	Lys	Val	Gln	Ala	Glu	Phe	Pro	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Thr	Ala	His	Arg
					85					90					95	
30	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Phe	Gly	Ser	Tyr	Asn	Asn	His	Ala	Trp	Ser	Phe
					100				105					110		
35	Pro	Ser	Glu	Pro	Val	Lys	Leu	Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Ile	Glu	Ala	Thr
					115				120				125			
40	Ser	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Pro	Asp	Thr	Trp	Gly	Thr	Tyr
					130				135				140			
45	<210>	17	<211>	393	<212>	PRT	<213>	Secuencia artificial								
50	<220>		<223>	Péptido												
	<400>	17														
55																
60																
65																

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

Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 165 170 175

5 Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 180 185 190

10 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 195 200 205

15 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 210 215 220

20 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 225 230 235 240

25 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 245 250 255

30 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 260 265 270

35 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 275 280 285

40 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 290 295 300

45 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 305 310 315 320

50 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 325 330 335

55 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 340 345 350

60 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 355 360 365

65 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 370 375 380

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390

<210> 18
<211> 393
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Péptido
<400> 18

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 486 673 T3

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

ES 2 486 673 T3

	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	
	210	215
5	220	
	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	
	225	230
	235	240
10	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	
	245	250
	255	
15	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
	260	265
	270	
20	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
	275	280
	285	
25	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu	
	290	295
	300	
	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	
	305	310
	315	320
30	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	
	325	330
	335	
35	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
	340	345
	350	
40	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	
	355	360
	365	
45	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	
	370	375
	380	
50	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	385	390
55	<210> 19	
	<211> 393	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Péptido	
	<400> 19	
65		

ES 2 486 673 T3

	Met	Gly	Met	Pro	Met	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Thr	Leu	Tyr	Leu
1					5						10					15
5	Leu	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Ser	Cys	Leu	Gly	Arg	Leu	Arg	Val	Pro	Tyr
					20					25					30	
10	Asp	Thr	Pro	Thr	Leu	Ser	Val	His	Pro	Gly	Pro	Glu	Val	Ile	Ser	Gly
					35					40					45	
15	Glu	Lys	Val	Thr	Phe	Tyr	Cys	Arg	Leu	Asp	Thr	Ala	Thr	Ser	Met	Phe
					50					55					60	
20	Leu	Leu	Leu	Gln	Glu	Gly	Gln	Ser	Ser	Gln	Val	Gln	Gln	Gly	Tyr	Gly
					65					70					80	
25	Thr	Val	Gln	Ala	Glu	Phe	Pro	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Thr	Ala	His	Arg
					85					90					95	
30	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Phe	Gly	Ser	Tyr	Asn	Asn	His	Ala	Trp	Ser	Phe
					100					105					110	
35	Pro	Ser	Glu	Pro	Val	Lys	Leu	Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Ile	Glu	Asn	Thr
					115					120					125	
40	Ser	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Pro	Asp	Thr	Trp	Gly	Thr	Tyr
					130					135					140	
45	Leu	Leu	Thr	Thr	Glu	Thr	Gly	Leu	Gln	Lys	Asp	His	Ala	Leu	Trp	Asp
					145					150					160	
50	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
					165					170					175	
55	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
					180					185					190	
60	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
					195					200					205	
65	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
					210					215					220	
70	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
					225					230					240	

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 245 250 255

5 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 260 265 270

10 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 275 280 285

15 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 290 295 300

20 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 305 310 315 320

25 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 325 330 335

30 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 340 345 350

35 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 355 360 365

40 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 370 375 380

45 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390

50 <210> 20
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido
 <400> 20

60

65

ES 2 486 673 T3

Met Gly Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

5 Leu Gly Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Arg Leu Arg Val Pro Tyr
20 25 30

10 Asp Thr Pro Ala Leu Ser Val His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser Gly
35 40 45

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met Phe			
	50	55	60	
5	Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr Gly			
	65	70	75	80
10	Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His Arg			
	85	90	95	
15	Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser Phe			
	100	105	110	
20	Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn Thr			
	115	120	125	
25	Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro Thr Phe Pro Asp Thr Trp Gly Thr Tyr			
	130	135	140	
30	Leu Leu Thr Thr Glu Thr Gly Leu Gln Lys Asp His Ala Leu Trp Asp			
	145	150	155	160
35	Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	165	170	175	
40	Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
	180	185	190	
45	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	195	200	205	
50	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
	210	215	220	
55	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	225	230	235	240
60	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	245	250	255	
65	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	260	265	270	
	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	275	280	285	

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 290 295 300

5 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 305 310 315 320

10 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 325 330 335

15 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 340 345 350

20 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 355 360 365

25 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 370 375 380

30 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390

35 <210> 21
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido
 <400> 21

Met Gly Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu
 1 5 10 15

45 Leu Gly Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Arg Leu Arg Val Pro Tyr
 20 25 30

50 Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser Gly
 35 40 45

55 Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met Phe
 50 55 60

60 Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr Gly
 65 70 75 80

65

	Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His Arg			
	85	90	95	
5	Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser Phe			
	100	105	110	
10	Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn Thr			
	115	120	125	
15	Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro Ala Phe Pro Asp Thr Trp Gly Thr Tyr			
	130	135	140	
20	Leu Leu Thr Thr Glu Thr Gly Leu Gln Lys Asp His Ala Leu Trp Asp			
	145	150	155	160
25	Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	165	170	175	
30	Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
	180	185	190	
35	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	195	200	205	
40	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
	210	215	220	
45	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	225	230	235	240
50	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	245	250	255	
55	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	260	265	270	
60	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	275	280	285	
65	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu			
	290	295	300	
	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	305	310	315	320

ES 2 486 673 T3

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
325 330 335

5

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
340 345 350

10

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
355 360 365

15

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
370 375 380

20

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390

25

<210> 22
<211> 393
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Péptido
<400> 22

35

40

45

50

55

60

65

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

ES 2 486 673 T3

	Ser	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Pro	Asp	Thr	Trp	Gly	Thr	Tyr
	130						135					140				
5	Leu	Leu	Thr	Thr	Glu	Thr	Gly	Leu	Gln	Lys	Asp	His	Ala	Leu	Trp	Asp
	145						150					155				160
10	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
							165				170					175
15	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
							180				185					190
20	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
							195				200					205
25	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
							210				215					220
30	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
	225						230					235				240
35	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
							245				250					255
40	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
							260				265					270
45	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
							275				280					285
50	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
							290				295					300
55	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
							305				310					320
60	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
							325				330					335
65	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
							340				345					350
	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
							355				360					365

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 370 375 380

5	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 385 390	
10	<210> 23 <211> 1197 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ADN <400> 23	
20	aagcttgcgg ccaccatggg aatgccatg gggctctgc aaccgtggc cacttgtac 60 ctgctgggga tgctggtcgc ttccctgcctc ggacggctca gggtacccta tgacacaccc 120	
25	accctctcggt ttcatcctgg acccgagggtg atctcgggag agaagggtgac cttctactgc 180 cgtctagaca ctgcaacaag catgttctta ctgctcaagg aggaaagatc cagccacgta 240	
30	cagcgcggat acgggaaggt ccaggcggag ttccccctgg gccctgtgac cacagcccac 300 cgagggacat accgatgttt tggctcctat aacaaccatg cctggtcttt ccccagttag 360	
35	ccagtgaagc tcctggtcac aggcgacatt gagaacacca gccttgcacc tgaagacccc 420 acctttcctg acacttgggg cacctacatt ttaaccacag agacgggact ccagaaagac 480	
40	catgcctct gggatccgga gcccaaattct tctgacaaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 540 ccagcacctg aattcgaggg tgcacccgtca gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac 600	
45	accctcatga tctcccgac ccctgagggtc acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa 660 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagtgc gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 720	
50	aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 780 caccaggact ggctaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 840	
55	gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaaggcagc cccgagagcc acagggtgac 900 accctgcggc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcgtgac ctgcctggc 960	
60	aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtggaga gcaatggca gccggagaac 1020 aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttttcctt ctacagcaag 1080 ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat 1140 gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agccttcctcc tgtctccggg taaatga 1197	
65	<210> 24 <211> 1197 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

5 <220>
 <223> ADN
 <400> 24

	aagcttgcgg ccaccatggg aatgccatg gggctctgc aaccgctggc caccttgtac	60
	ctgctggga tgctggtcgc ttccctgcctc ggacggctca gggtacccta tgacacaccc	120
10	accctctcggtt ttcattcctgg acccgagggtg atctcgggag agaagggtgac cttctactgc	180
	cgtctagaca ctgcaacaag catgttctta ctgctccagg agggacaatc cagccaggtta	240
15	cagcaggat acgggaaggt ccaggcggag ttccccctgg gccctgtgac cacagcccac	300
	cgagggacat accgatgttt tggctcttat aacaaccatg cctggtcttt ccccaagttag	360
20	ccagtgaagc tcctggtcac aggcgacatt gagaacaccca gccttgcacc tgaagacccc	420
	acctttcctg acacttgggg cacctacctt ttaaccacag agacgggact ccagaaagac	480
	catgccctct gggatccgga gcccaaatact tctgacaaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	540
25	ccagcacctg aattcgaggg tgcaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac	600
	accctcatga tctccggac ccctgagggtc acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa	660
30	gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	720
	aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	780
	caccaggact ggctgaatgg caaggagttac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca	840
35	gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac	900
	accctgcccc catccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc	960
40	aaaggcttct atcccaagcga catgcgttg gagtggaga gcaatggca gccggagaac	1020
	aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttttcctt ctacagcaag	1080
	ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACGTCT tctcatgctc cgtgtatgcat	1140
45	gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agccttcctt tgtctccggg taaaatga	1197
	<210> 25	
50	<211> 1197	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> ADN	
	<400> 25	
60		
65		

	aagcttgcgg ccaccatggg aatgcccatg gggctctgc aaccgctggc cacctgtac	60
5	ctgctgggga tgctggtcgc ttccctgcctc ggacggctca gggtacccta tgacacaccc	120
	accctctcggtt ttcattcctgg acccgagggtg atctcgggag agaagggtgac cttctactgc	180
10	cgtctagaca ctgcaacaag catgttctta ctgctccagg agggacaatc cagccaggtaa	240
	cagcagggat acgggacagt ccaggcggag ttccccctgg gccctgtgac cacagcccac	300
15	cgagggacat accgatgttt tggctcctat aacaaccatg cctggcttt ccccaagttag	360
	ccagtgaagc tcctggtcac aggcgacatt gagaacacca gccttgacc tgaagacccc	420
20	acctttcctg acacttgggg cacctacctt ttaaccacag agacggact ccagaaagac	480
	catgccctct gggatccggaa gcccaaattt tctgacaaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	540
	ccagcacctg aattcgaggg tgcaccgtca gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac	600
25	accctcatga tctccggac ccctgaggta acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa	660
	gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaatgt gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	720
	aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	780
30	caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca	840
	gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac	900
35	accctgcccc catccgggaa tgagctgacc aagaaccagg tcagcgtgac ctgcctggc	960
	aaaggcttct atcccagcga catgcgttg gagtggaga gcaatggca gccggagaac	1020
40	aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttttcctt ctacagcaag	1080
	ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACGTCT tctcatgctc cgtatgcata	1140
	gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga	1197
45	<210> 26 <211> 1197 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> ADN <400> 26	
55		
60		
65		

	aagcttgcgg ccaccatggg aatgccatg gggctctgc aaccgctggc caccttgtac	60
	ctgctgggaa tgctggtcgc ttccctgcctc ggacggctca gggtacccta tgacacaccc	120
5	gcccctctcggt ttcatcctgg acccgagggtg atctcgggag agaagggtgac cttctactgc	180
	cgtctagaca ctgcaacaag catgttctta ctgctcaagg agggaaagatc cagccacgtac	240
10	cagcgcggat acgggaaggt ccaggcggag ttccccctgg gcccctgtgac cacagcccac	300
	cgagggacat accgatgttt tggctcctat aacaaccatg cctggcttt ccccagttag	360
	ccagtgaagc tcctggtcac aggcgacatt gagaacacca gccttgacc tgaagacccc	420
15	acctttcctg acacttgggg cacctacctt ttaaccacag agacggact ccagaaagac	480
	catgccctct gggatccggaa gcccaaattct tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	540
20	ccagcacctg aattcgaggg tgcacccgtca gtcttcctct tcccccaaa accaaggac	600
	accctcatga tctcccgac ccctgagggtc acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa	660
	gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	720
25	aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	780
	caccaggact ggctgaatgg caaggagttac aagtgcacgg tctccaacaa agccctccca	840
30	gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc acagggtgtac	900
	accctgc(cc) catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc	960
	aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatggca gccggagaac	1020
35	aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttcttcct ctacagcaag	1080
	ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACGTCT ttcatgctc cgttatgtcat	1140
40	gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga	1197

45 <210> 27
 <211> 1197
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> ADN
 <400> 27

55

60

65

	aagcttgcgg ccaccatggg aatgccatg gggctctgc aaccgctggc caccttgtac	60
	ctgctgggaa tgctggtcgc ttccctgcctc ggacggctca gggtacccta tgacacaccc	120
5	accctctcggt ttcatcctgg acccgagggtg atctcgggag agaagggtac cttctactgc	180
	cgtctagaca ctgcaacaag catgttctta ctgctcaagg agggaaagatc cagccacgtac	240
10	cagcgcggat acgggaagggt ccaggcggag ttccccctgg gccctgtgac cacagcccac	300
	cgagggacat accgatgttt tggctcctat aacaaccatg cctggcttt ccccaagttag	360
	ccagtgaagc tcctggtcac aggcgacatt gagaacacca gccttgacc tgaagacccc	420
15	gcctttctg acacttgggg cacctacctt ttaaccacag agacggact ccagaaagac	480
	catgccctct gggatccgga gcccaaatact tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	540
20	ccagcacctg aattcgaggg tgcaccgtca gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac	600
	accctcatga tctcccgac ccctgaggac acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa	660
	gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacggt gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	720
25	aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	780
	caccaggact ggctgaatgg caaggagttac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca	840
30	gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac	900
	accctcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc	960
	aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtggaga gcaatggca gccggagaac	1020
35	aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttcttcct ctacagcaag	1080
	ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat	1140
40	gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga	1197
	<210> 28	
	<211> 1197	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN	
	<400> 28	
50		

55

60

65

	aagcttgcgg ccaccatggg aatgcccatg gggtctctgc aaccgctggc caccttgtac	60
	ctgctgggaa tgctggtcgc ttccctgcctc ggacggctca gggtacccta tgacacaccc	120
5	accctctcggtt tcatacctgg acccgagggtg atctcgggag agaagggtgac cttctactgc	180
	cgtctagaca ctgcaacaag catgttctta ctgctcaagg agggaaagatc cagccacgta	240
10	cagcgcggat acgggaaggt ccaggcggag ttccccctgg gccctgtgac cacagcccac	300
	cgagggacat accgatgttt tggctcctat aacaaccatg cctggtcttt ccccagttag	360
	ccagtgaagc tcctggtcac aggcgacatt gaggccacca gccttgcacc tgaagacccc	420
15	acctttcctg acacttgggg cacctacattt ttaaccacag agacggact ccagaaagac	480
	catgccctct gggatccgga gcccaaattct tctgacaaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	540
20	ccagcacctg aattcgaggg tgcaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac	600
	accctcatga tctccggac ccctgaggta acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa	660
	gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	720
25	aagccgcggg aggaggacta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	780
	caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca	840
30	gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac	900
	accctgcccc catccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc	960
35	aaaggcttct atcccagcga catgcgttg gagtgggaga gcaatggca gccggagaac	1020
	aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttttttctt ctacagcaag	1080
	ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACGTCT tctcatgctc cgtatgtcat	1140
40	gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga	1197

45 <210> 29
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Péptido
 <400> 29

55

60

65

ES 2 486 673 T3

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

5 Gln Arg Ile Ser Ala Gln Gln Thr Leu Pro Lys Pro Phe Ile Trp
20 25 30

10 Ala Glu Pro His Phe Met Val Pro Lys Glu Lys Gln Val Thr Ile Cys
35 40 45

15 Cys Gln Gly Asn Tyr Gly Ala Val Glu Tyr Gln Leu His Phe Glu Gly
50 55 60

20 Ser Leu Phe Ala Val Asp Arg Pro Lys Pro Pro Glu Arg Ile Asn Lys
65 70 75 80

25 Val Lys Phe Tyr Ile Pro Asp Met Asn Ser Arg Met Ala Gly Gln Tyr
85 90 95

30 Ser Cys Ile Tyr Arg Val Gly Glu Leu Trp Ser Glu Pro Ser Asn Leu
100 105 110

35 Leu Asp Leu Val Val Thr Glu Met Tyr Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val
115 120 125

40 His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser Gly Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys
130 135 140

45 Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met Phe Leu Leu Lys Glu Gly Arg
145 150 155 160

50

55

60

65

Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr Gly Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro
 165 170 175
 5 Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly
 180 185 190
 10 Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser Phe Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu
 195 200 205
 15 Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro
 210 215 220
 20 Thr Phe Pro Ala Asp Thr Trp Gly Thr Tyr Leu Leu Thr Thr Glu Thr
 225 230 235 240
 25 Gly Leu Gln Lys Asp His Ala Leu Trp Asp His Thr Ala Gln Asn Leu
 245 250 255
 30 Leu Arg Met Gly Leu Ala Phe Leu Val Leu Val Ala Leu Val Trp Phe
 260 265 270
 Leu Val Glu Asp Trp Leu Ser Arg Lys Arg Thr Arg Glu Arg Ala Ser
 275 280 285
 35 Arg Ala Ser Thr Trp Glu Gly Arg Arg Arg Leu Asn Thr Gln Thr Leu
 290 295 300
 40 <210> 30
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Péptido
 <400> 30
 50
 55
 60
 65

ES 2 486 673 T3

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

5 Gln Arg Ile Ser Ala Gln Gln Thr Leu Pro Lys Pro Phe Ile Trp
 20 25 30

10 Ala Glu Pro His Phe Met Val Pro Lys Glu Lys Gln Val Thr Ile Cys
 35 40 45

15 Cys Gln Gly Asn Tyr Gly Ala Val Glu Tyr Gln Leu His Phe Glu Gly
 50 55 60

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 486 673 T3

	Ser Leu Phe Ala Val Asp Arg Pro Lys Pro Pro Glu Arg Ile Asn Lys			
65	70	75	80	
5	Val Lys Phe Tyr Ile Pro Asp Met Asn Ser Arg Met Ala Gly Gln Tyr			
	85	90	95	
10	Ser Cys Ile Tyr Arg Val Gly Glu Leu Trp Ser Glu Pro Ser Asn Leu			
	100	105	110	
15	Leu Asp Leu Val Val Thr Glu Met Tyr Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val			
	115	120	125	
20	His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser Gly Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys			
	130	135	140	
25	Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met Phe Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg			
	145	150	155	160
30	Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr Gly Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro			
	165	170	175	
35	Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly			
	180	185	190	
40	Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser Phe Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu			
	195	200	205	
45	Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro			
	210	215	220	
50	Thr Phe Pro Asp His Ala Leu Trp Asp His Thr Ala Gln Asn Leu Leu			
	225	230	235	240
55	Arg Met Gly Leu Ala Phe Leu Val Leu Val Ala Leu Val Trp Phe Leu			
	245	250	255	
60	Val Glu Asp Trp Leu Ser Arg Lys Arg Thr Arg Glu Arg Ala Ser Arg			
	260	265	270	
65	Ala Ser Thr Trp Glu Gly Arg Arg Arg Leu Asn Thr Gln Thr Leu			
	275	280	285	
	<210> 31			
	<211> 209			

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido
 <400> 31

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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

Gln Arg Ile Ser Ala Gln Gln Met Tyr Asp Thr Pro Thr Leu Ser
 20 25 30

Val His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser Gly Glu Lys Val Thr Phe Tyr
 35 40 45

Cys Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met Phe Leu Leu Lys Glu Gly
 50 55 60

Arg Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr Gly Lys Val Gln Ala Glu Phe
 65 70 75 80

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

Gly Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser Phe Pro Ser Glu Pro Val Lys
 100 105 110

Leu Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp
 115 120 125

Pro Thr Phe Pro Ala Asp Thr Trp Gly Thr Tyr Leu Leu Thr Thr Glu
 130 135 140

Thr Gly Leu Gln Lys Asp His Ala Leu Trp Asp His Thr Ala Gln Asn
 145 150 155 160

Leu Leu Arg Met Gly Leu Ala Phe Leu Val Leu Val Ala Leu Val Trp
 165 170 175

Phe Leu Val Glu Asp Trp Leu Ser Arg Lys Arg Thr Arg Glu Arg Ala
 180 185 190

Ser Arg Ala Ser Thr Trp Glu Gly Arg Arg Arg Leu Asn Thr Gln Thr
 195 200 205

Leu

65 <210> 32
 <211> 192

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido
 <400> 32

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

15 Gln Arg Ile Ser Ala Gln Gln Met Tyr Asp Thr Pro Thr Leu Ser
 20 25 30

20 Val His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser Gly Glu Lys Val Thr Phe Tyr
 35 40 45

25 Cys Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met Phe Leu Leu Lys Glu Gly
 50 55 60

30 Arg Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr Gly Lys Val Gln Ala Glu Phe
 65 70 75 80

35 Pro Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe
 85 90 95

40 Gly Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser Phe Pro Ser Glu Pro Val Lys
 100 105 110

45 Leu Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp
 115 120 125

50 Pro Thr Phe Pro Asp His Ala Leu Trp Asp His Thr Ala Gln Asn Leu
 130 135 140

55 Leu Arg Met Gly Leu Ala Phe Leu Val Leu Val Ala Leu Val Trp Phe
 145 150 155 160

60 Leu Val Glu Asp Trp Leu Ser Arg Lys Arg Thr Arg Glu Arg Ala Ser
 165 170 175

65 Arg Ala Ser Thr Trp Glu Gly Arg Arg Arg Leu Asn Thr Gln Thr Leu
 180 185 190

ES 2 486 673 T3

5 <210> 33
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 33

10 Pro Thr Leu Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Cys Leu Ser Gln Arg
 1 5 10 15

15 Ile Asn Thr Glu Lys Glu Thr Leu Pro Lys Pro Ile Ile Trp Ala Lys
 20 25 30

20 Pro Ser Ile Met Val Thr Asn Gly Asn Ser Val Asn Ile Trp Cys Gln
 35 40 45

25 Gly Ala Gln Ser Ala Ser Glu Tyr Gln Leu Tyr Phe Glu Gly Ser Phe
 50 55 60

30 Phe Ala Leu Glu Arg Pro Lys Pro Ser Arg Ser Met Asn Lys Val Arg
 65 70 75 80

35 Phe Phe Ile Ser Gln Met Thr Ser His Thr Ala Gly Ile Tyr Thr Cys
 85 90 95

40 Phe Tyr Gln Ser Gly Glu Leu Trp Ser Lys Ser Ser Asn Pro Leu Lys
 100 105 110

45 Leu Val Val Thr Gly Leu Tyr Asp Thr Pro Asn Leu Trp Val Tyr Pro
 115 120 125

50 Arg Pro Glu Val Thr Leu Gly Glu Asn Val Thr Phe Phe Cys Gln Leu
 130 135 140

55 Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Phe Leu Leu Lys Glu Arg Gly Ser Asn
 145 150 155 160

60 His Ile Gln Asn Lys Tyr Gly Asn Ile Gln Ala Glu Phe Pro Met Gly
 165 170 175

65 Pro Val Thr Arg Ala His Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Tyr
 180 185 190

ES 2 486 673 T3

Asn Asp Tyr Ala Trp Ser Phe Pro Ser Glu Pro Val Thr Leu Leu Ile
195 200 205

5 Thr Gly Gly Val Glu Asn Ser Ser Leu Ala Pro Thr Asp Pro Thr Ser
210 215 220

10 Ser Leu Asp Tyr Trp Glu Phe Asp Leu Ser Thr Asn Glu Ser Gly Leu
225 230 235 240

15 Gln Lys Asp Ser Ala Phe Trp Asp His Thr Thr Gln Asn Leu Ile Arg
245 250 255

20 Ile Gly Leu Ala Cys Ile Ile Leu Ile Thr Leu Val Trp Leu Leu Thr
260 265 270

25 Glu Asp Trp Leu Ser Lys Arg Lys Asp His Glu Glu Ala Asn Arg Leu
275 280 285

30 Thr Asn Trp Glu Cys Arg Arg Arg Trp Arg Met Gln His Tyr Phe Glu
290 295 300

35 Glu Glu Gln Arg Asn Ala Ile Ser Met Met Glu Leu Lys Ala Thr Pro
305 310 315 320

40 Gly Ala Leu
<210> 34
<211> 325
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Péptido
<400> 34

50

55

60

65

ES 2 486 673 T3

Met Leu Pro Thr Leu Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Cys Leu Ser
1 5 10 15

5 Gln Arg Ile Asn Thr Glu Lys Glu Thr Leu Pro Lys Pro Ile Ile Trp
20 25 30

10 Ala Lys Pro Ser Ile Met Val Thr Asn Gly Asn Ser Val Asn Ile Trp
35 40 45

15 Cys Gln Gly Ala Gln Ser Ala Ser Glu Tyr Gln Leu Tyr Phe Glu Gly
50 55 60

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 486 673 T3

Ser Phe Phe Ala Leu Glu Arg Pro Lys Pro Ser Arg Ser Met Asn Lys
 65 70 75 80

5 Val Arg Phe Phe Ile Ser Gln Met Thr Ser His Thr Ala Gly Ile Tyr
 85 90 95

10 Thr Cys Phe Tyr Gln Ser Gly Glu Leu Trp Ser Lys Ser Ser Asn Pro
 100 105 110

15 Leu Lys Leu Val Val Thr Gly Leu Tyr Asp Thr Pro Asn Leu Trp Val
 115 120 125

20 Tyr Pro Gln Pro Glu Val Thr Leu Gly Glu Asn Val Thr Phe Phe Cys
 130 135 140

25 Gln Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Phe Leu Leu Lys Glu Arg Gly
 145 150 155 160

30 Ser Asn His Ile Gln Asn Lys Tyr Gly Asn Ile Gln Ala Glu Phe Pro
 165 170 175

35 Met Gly Pro Val Thr Arg Ala His Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly
 180 185 190

40 Ser Tyr Asn Asp Tyr Ala Trp Ser Phe Pro Ser Glu Pro Val Thr Leu
 195 200 205

45 Leu Ile Thr Gly Gly Val Glu Asn Ser Ser Leu Ala Pro Thr Asp Pro
 210 215 220

50 Thr Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Glu Phe Asp Leu Ser Thr Asn Glu Ser
 225 230 235 240

55 Gly Leu Gln Lys Asp Ser Ala Phe Trp Asp His Thr Thr Gln Asn Leu
 245 250 255

60 Ile Arg Ile Gly Leu Ala Cys Ile Ile Leu Ile Thr Leu Val Trp Leu
 260 265 270

65 Leu Thr Glu Asp Trp Leu Ser Lys Arg Lys Asp His Glu Glu Ala Asn
 275 280 285

Arg Leu Thr Asn Trp Glu Cys Arg Arg Arg Trp Arg Met Gln His Tyr
 290 295 300

ES 2 486 673 T3

Phe Glu Glu Glu Gln Arg Asn Ala Ile Ser Met Met Glu Leu Lys Ala
 305 310 315 320

5 Thr Pro Gly Ala Leu
 325

10 <210> 35
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido
 <400> 35

20 Thr Gln Thr Leu Asp Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
 1 5 10 15

25 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe
 20 25 30

30 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 35 40 45

35 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 50 55 60

40 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 65 70 75 80

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

50 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 100 105 110

55 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 115 120 125

60 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 130 135 140

65 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 145 150 155 160

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
165 170 175

5 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
180 185 190

10 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
195 200 205

15 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
210 215 220

20 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

25

30

35

40

45

50

55

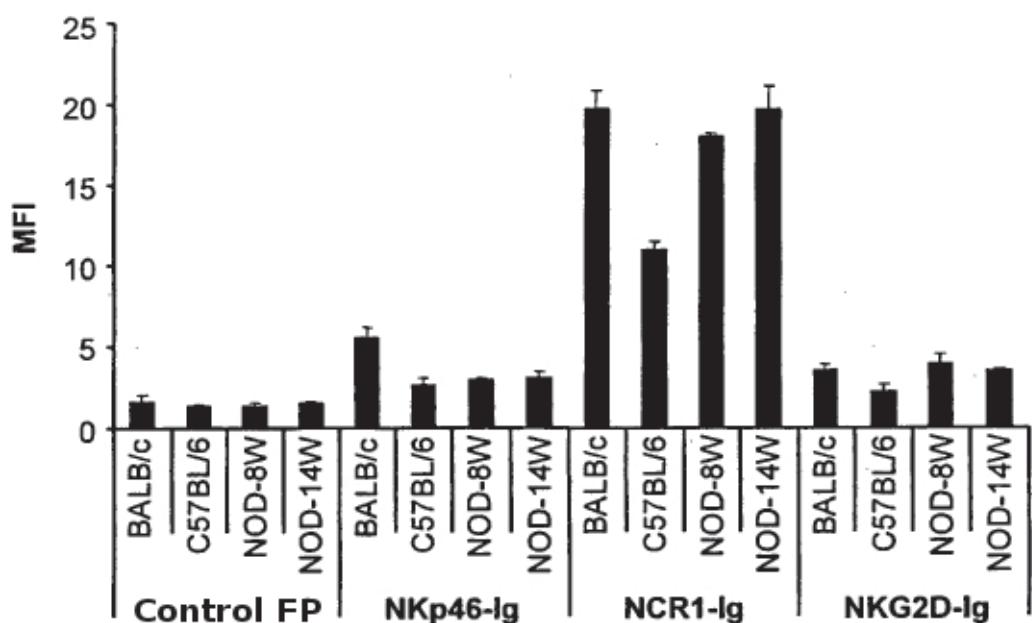
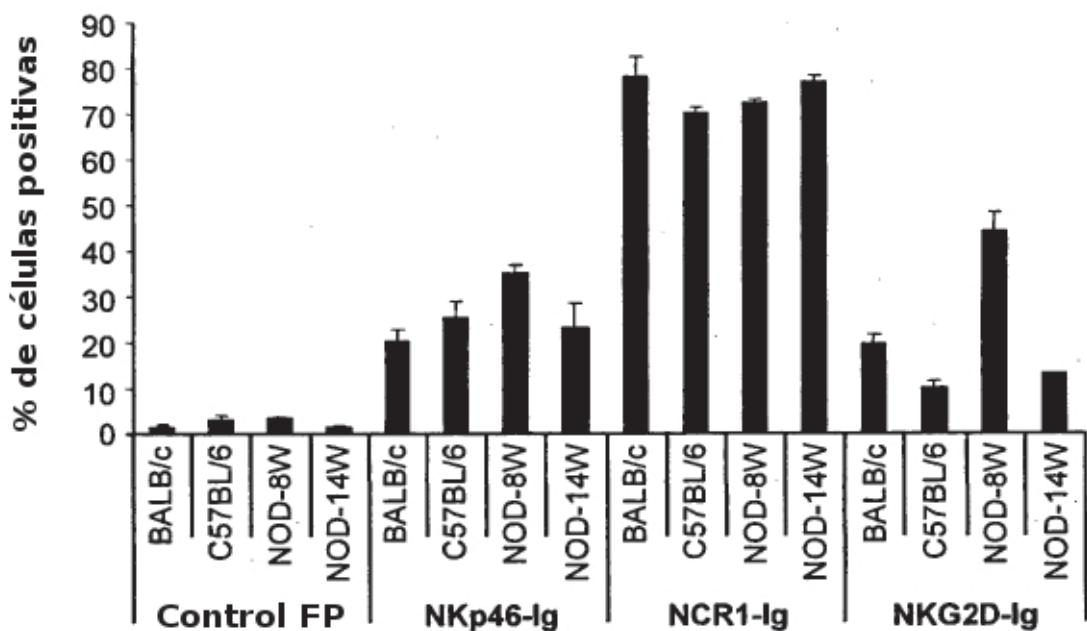
60

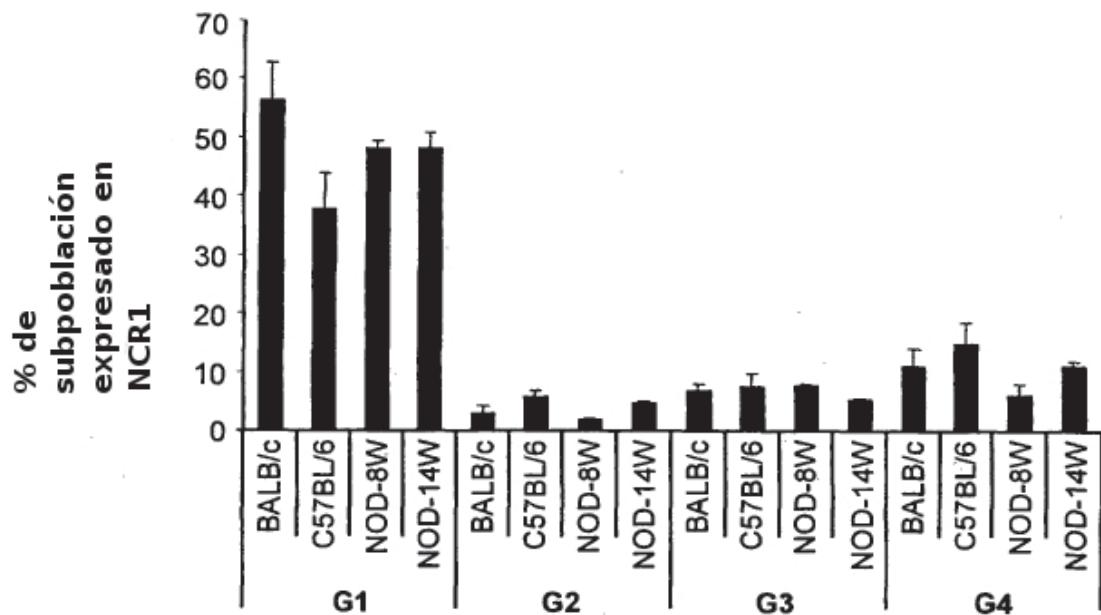
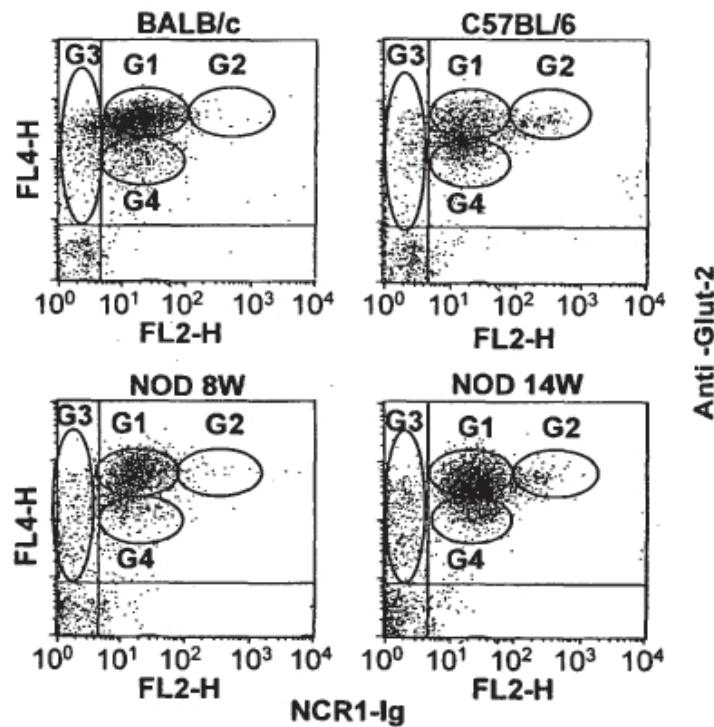
65

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende, al menos, una proteína y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que la proteína se selecciona del grupo formado por:
- 5 una proteína que comprende un fragmento aislado de la región extracelular de NKp46; un anticuerpo específico para la región extracelular de NKp46, y una combinación de los mismos,
- 10 para su uso en la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 1.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la proteína es una proteína que comprende un fragmento aislado de la región extracelular de NKp46; o en la que la NKp46 es NKp46 humana, preferiblemente en el que la NKp46 humana es una isoforma seleccionada del grupo formado por una isoforma a, una isoforma b, una isoforma c y una isoforma d.
- 15 3. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el fragmento aislado de la región extracelular de NKp46 comprende el dominio D2 o un fragmento del mismo.
- 20 4. La composición para su uso según la reivindicación 3, en la que el fragmento aislado está sustancialmente desprovisto del dominio D1; o en la que el fragmento aislado comprende el dominio D2 o un fragmento del mismo, y un fragmento del dominio D1; o
- 25 en la que el dominio D2 se selecciona del grupo formado por la SEQ ID N°: 1; SEQ ID N°: 2; SEQ ID N°: 3; SEQ ID N°: 4; SEQ ID N°: 9 y SEQ ID N°: 10; o
- en la que el fragmento aislado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por las SEQ ID NOS: 1-10; o
- en la que el fragmento aislado corresponde a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por las SEQ ID NOS: 1-10; o
- 30 en la que el fragmento aislado comprende una variante de dominio D2, en la que la variante comprende al menos una sustitución de aminoácidos en el dominio D2, preferiblemente en la que la sustitución de al menos un ácido amino está en un residuo seleccionado del grupo formado por treonina 125, treonina 225, lisina 157, lisina 170, arginina 160, arginina 166, histidina 163, asparagina 216, y una combinación de los mismos, en la que los números corresponden a las posiciones de los residuos de la SEQ ID N°: 29, más preferiblemente en la que la sustitución de aminoácidos se selecciona entre el grupo formado por T125A; T225A; T225S; T225N; N216A; K157Q; R160Q; H163Q; R166Q; K170T y una combinación de los mismos, en la que los números corresponden a las posiciones de los residuos de NKp46 de la SEQ ID N°: 29; o, alternativamente, preferiblemente en el que la variante de dominio D2 se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID N°: 12 – 16.
- 40 5. La composición para su uso según la reivindicación 3, en la que la proteína que comprende un fragmento aislado de la región extracelular de NKp46 se selecciona del grupo formado por una proteína de fusión y un conjugado de proteína.
- 45 6. La composición para su uso según la reivindicación 5, en la que la proteína de fusión comprende un primer segmento y un segundo segmento, en la que el primer segmento comprende el dominio D2 o un fragmento del mismo, y en la que el segundo segmento comprende al menos una proteína heteróloga seleccionada del grupo formado por: una inmunoglobulina, una citoquina, una proteína inmunomoduladora o péptido, un receptor de NK distinta de NKp46, una hormona, un factor de crecimiento y fragmentos de los mismos.
- 50 7. La composición para su uso según la reivindicación 6, en la que la proteína heteróloga es un fragmento de inmunoglobulina, preferiblemente en la que el fragmento de inmunoglobulina es la región Fc de la IgG1 o, alternativamente, preferiblemente en la que el dominio D2 o fragmento de la misma se selecciona del grupo formado por las SEQ ID N°: 1 - 10 y 12 - 16; o
- 55 en la que la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por las SEQ ID N°: 17 - 22; o en la que la proteína de fusión comprende una variante del dominio D2 como primer segmento, en la que la variante comprende al menos una sustitución de aminoácidos en el dominio D2 en un residuo seleccionado del grupo formado por treonina 125, treonina 225, lisina 157, lisina 170, arginina 160, arginina 166, histidina 163, asparagina 216, y una combinación de los mismos; en la que los números corresponden a las posiciones de los residuos de la SEQ ID N°: 29; preferiblemente en la que la proteína de fusión comprende la región Fc de la IgG1 como segundo segmento; más preferiblemente en la que el primer segmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por las SEQ ID N°: 12 - 16; o
- 60 en la que la citoquina se selecciona del grupo formado por IL - 2, IL - 4 e IL - 10; o en el que la proteína inmunomoduladora o péptido se selecciona del grupo formado por la proteína de choque térmico 60 (Hsp60) o un fragmento de la misma, roquinimex, el antígeno de fijación al complemento de fiebre Q (QFA), anticuerpo antiCD3 y una combinación de los mismos; o en la que el receptor de NK diferente de NKp46 es NKG2D; o en la que la hormona se selecciona del grupo formado por insulina, glucagón y una combinación de los mismos.
- 65

8. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición comprende un anticuerpo específico para la región extracelular de NKp46 en el que el anticuerpo es un anticuerpo sin deplecionar.
- 5 9. La composición para su uso según la reivindicación 8 en la que el anticuerpo es específico para el dominio D2.
- 10 10. La composición para su uso según la reivindicación 9, en la que el anticuerpo se selecciona del grupo formado por un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de cadena sencilla y un anticuerpo humanizado; o en la que la composición comprende tanto una proteína que comprende un fragmento aislado de la región extracelular de NKp46; como un anticuerpo específico para la región extracelular de NKp46, en la que el anticuerpo es un anticuerpo sin deplecionar.
- 15 11. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la diabetes tipo 1 se selecciona del grupo formado por preinsulitis, insulitis temprana, prediabetes, diabetes manifiesta y una combinación de los mismos.
- 20 12. La composición para su uso según la reivindicación 11, en donde la composición se administra después de la detección de al menos uno de los niveles de glucosa en ayunas en sangre y de los niveles de tolerancia a la glucosa en la materia; o donde se determinan antes de y después de la administración de la composición que comprende además al menos uno de los niveles de glucosa en sangre en ayunas y los niveles de tolerancia a la glucosa en el sujeto; o en la que la composición se administra como una sola dosis o de dosis múltiples, preferiblemente en múltiples dosis a intervalos semanales; o
- 25 en la que la composición se administra por una vía seleccionada de entre el grupo que consiste en administración parenteral, oral, transdérmica y tópica; o en la que la composición se administra en combinación con al menos un agente inmunomodulador o inmunoestimulador, preferiblemente en la que el agente inmunomodulador o inmunoestimulador se selecciona del grupo formado por bacilo de Calmette - Guérin (BCG), proteína de choque térmico 60 (Hsp60) o un fragmentos de la misma, roquinimex, antígeno al complemento de fiebre Q (QFA), anticuerpo antiCD3, α - galactosliceramida, un adyuvante y una combinación de los mismos.
- 30 13. Una proteína que comprende un fragmento aislado de la región extracelular de NKp46 para su uso en la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 1.
- 35 14. Un anticuerpo específico para la región extracelular de NKp46 para su uso en la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 1, en la que el anticuerpo es un anticuerpo sin deplecionar.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

**FIGURA 1A****FIGURA 1B**

**FIGURA 1C****FIGURA 1D**

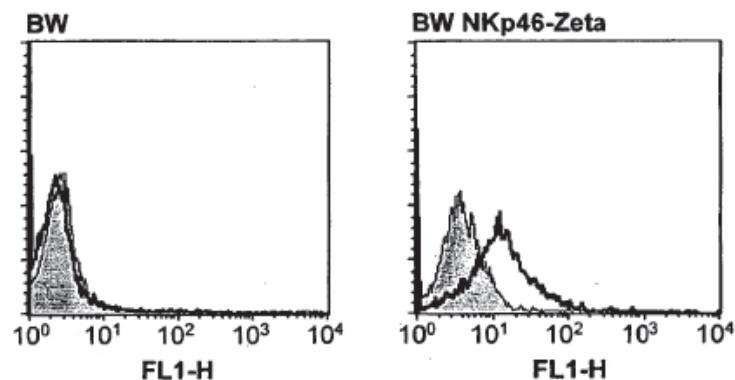


FIGURA 2A

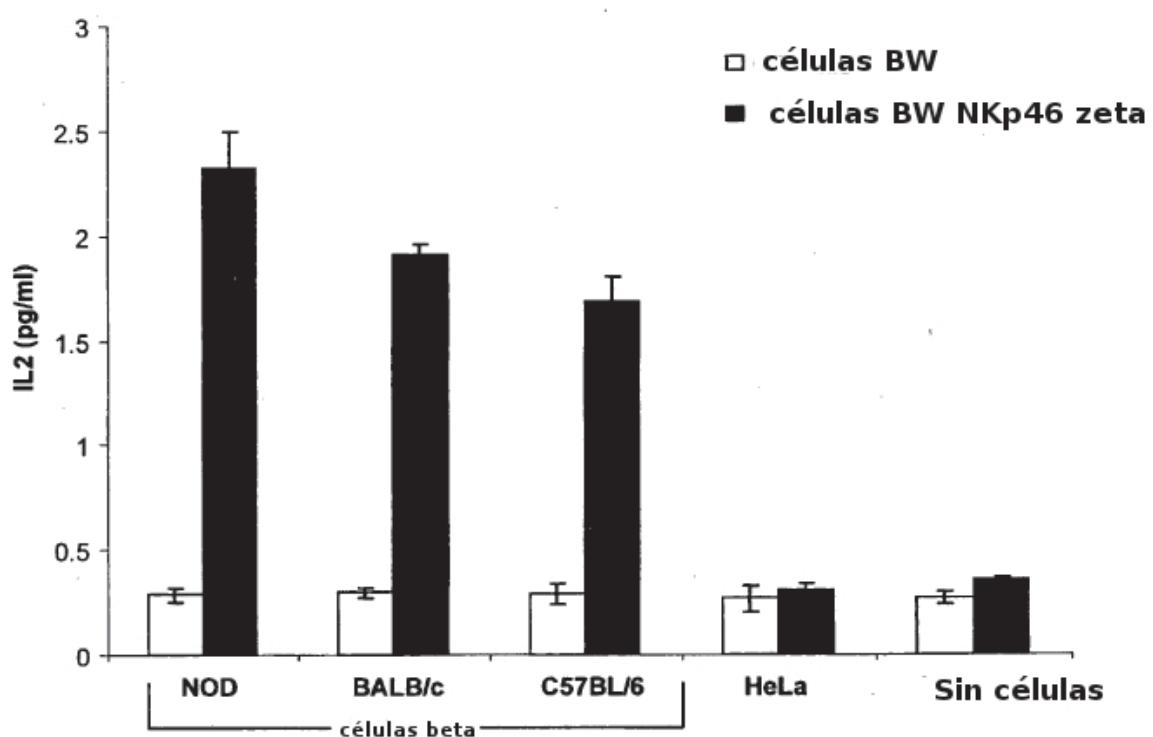
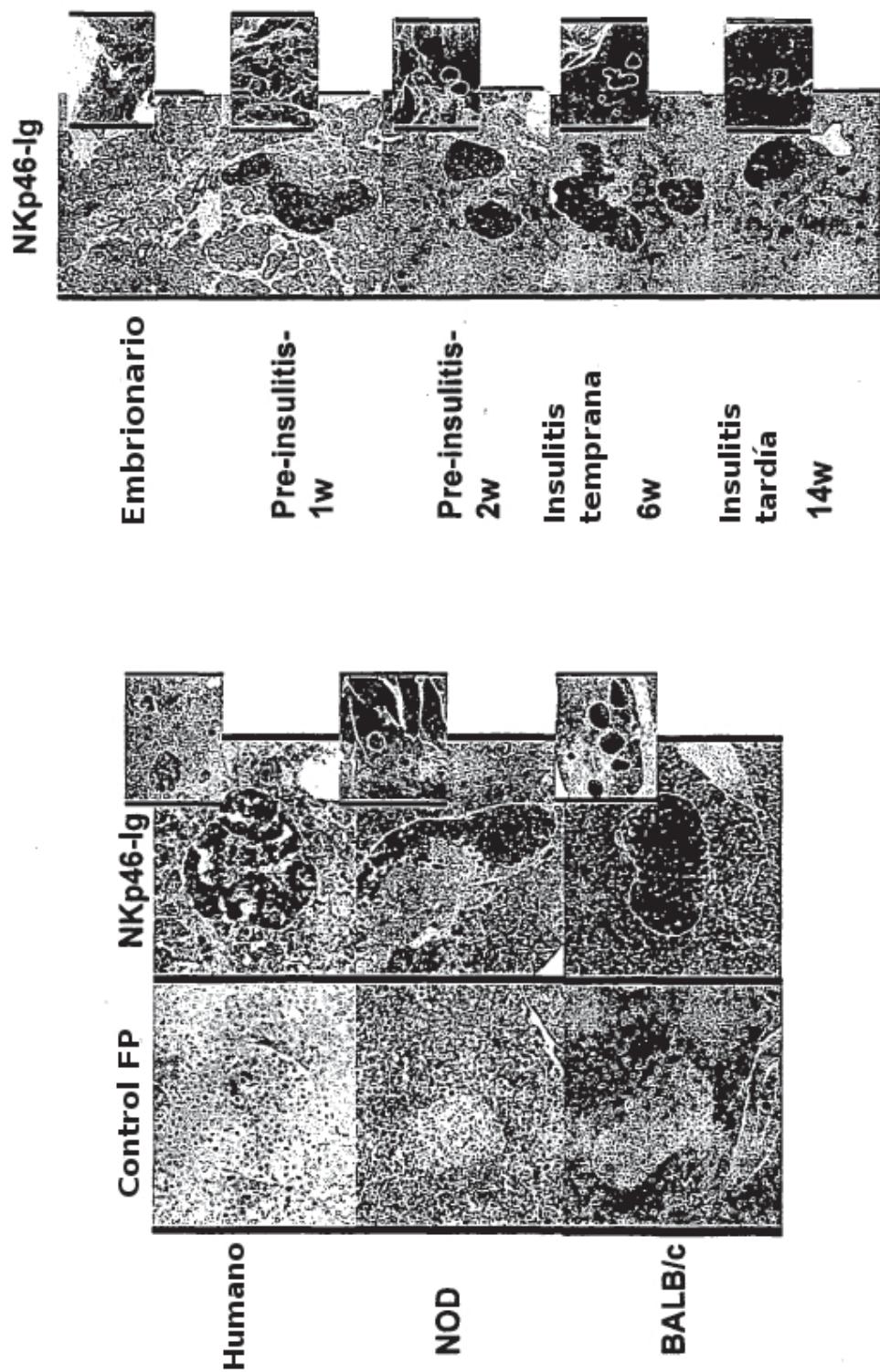


FIGURA 2B

**FIGURA 3B****FIGURA 3A**

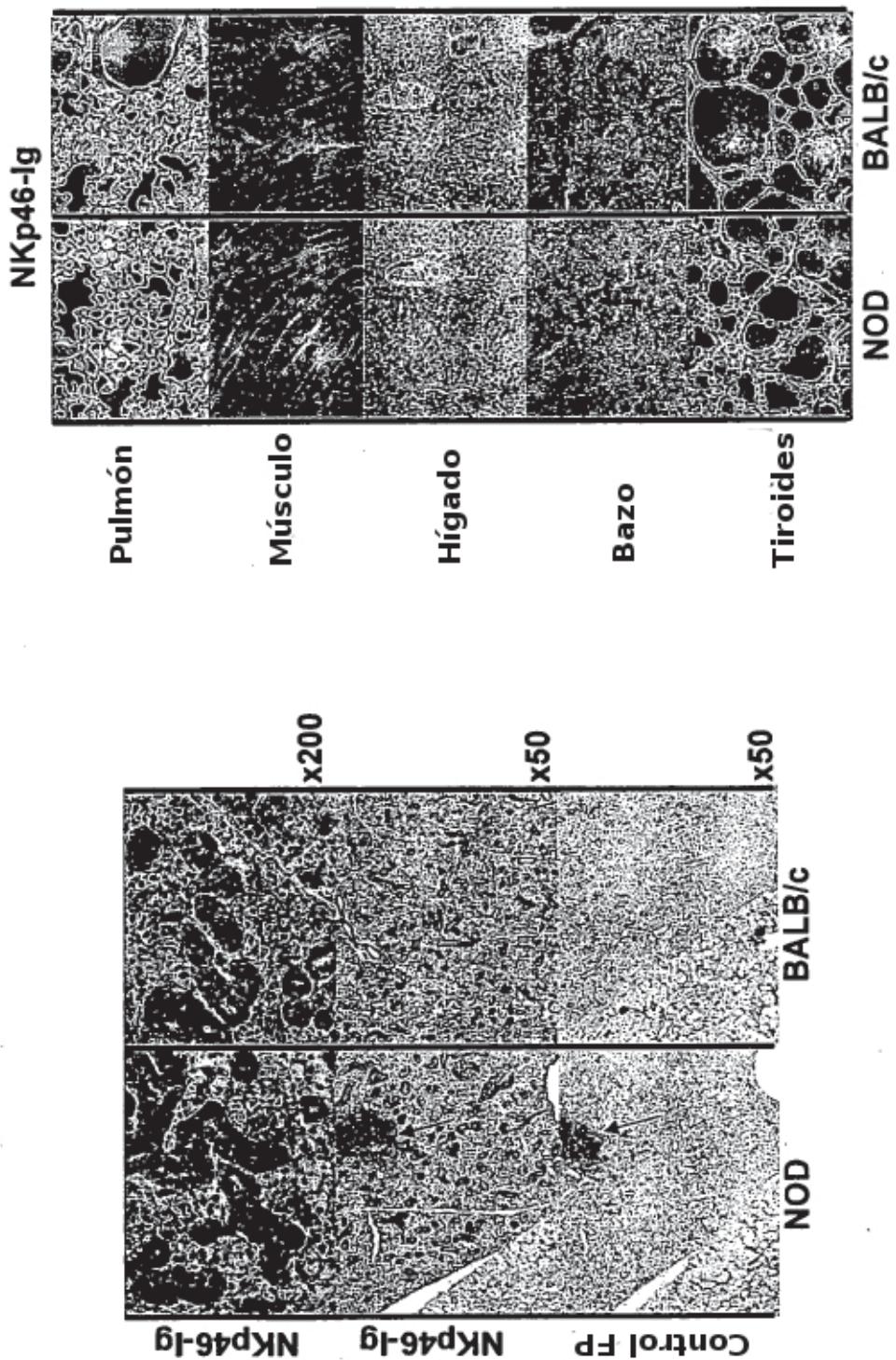


FIGURA 3D

FIGURA 3C

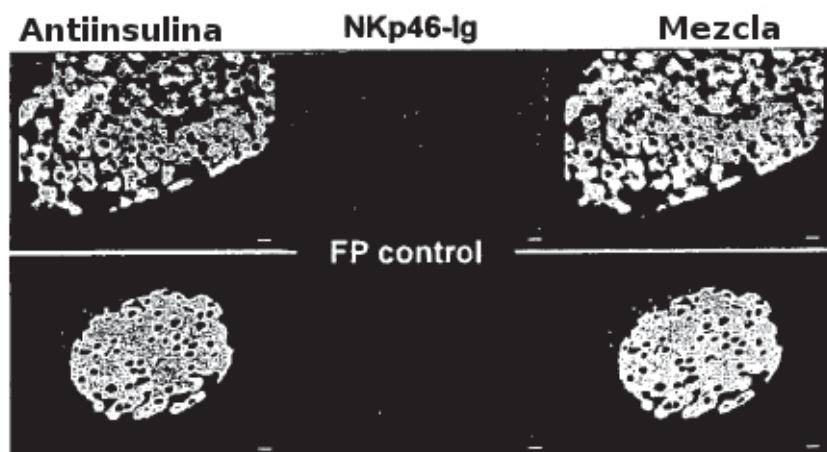


FIGURA 3E

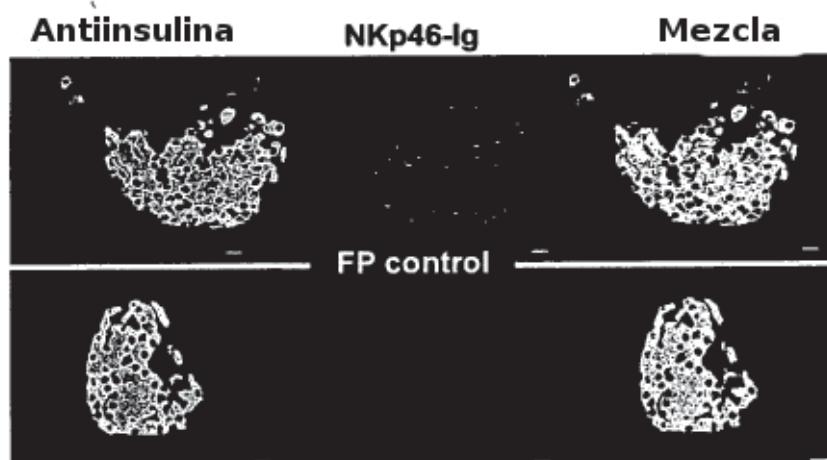


FIGURA 3F

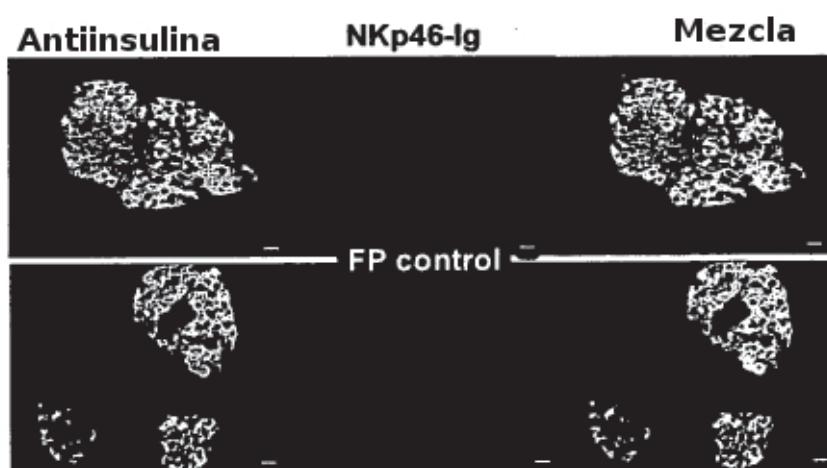


FIGURA 3G

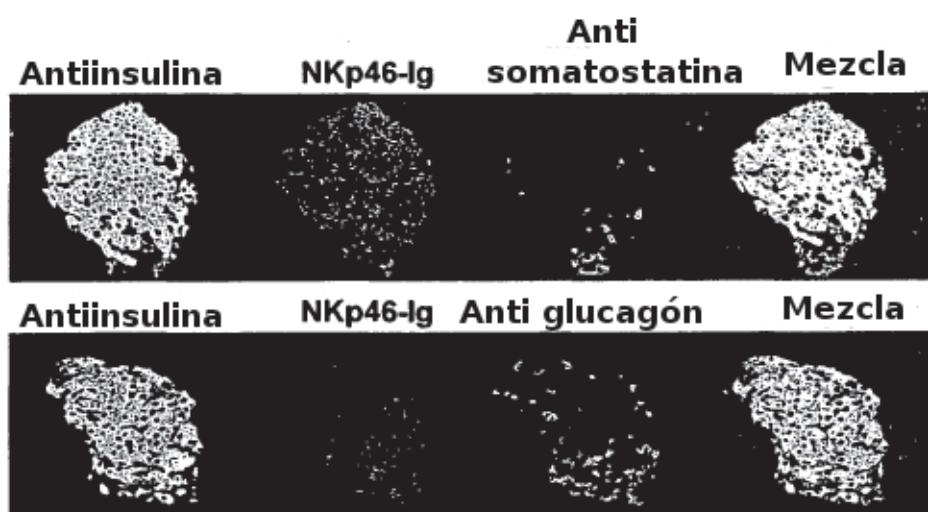
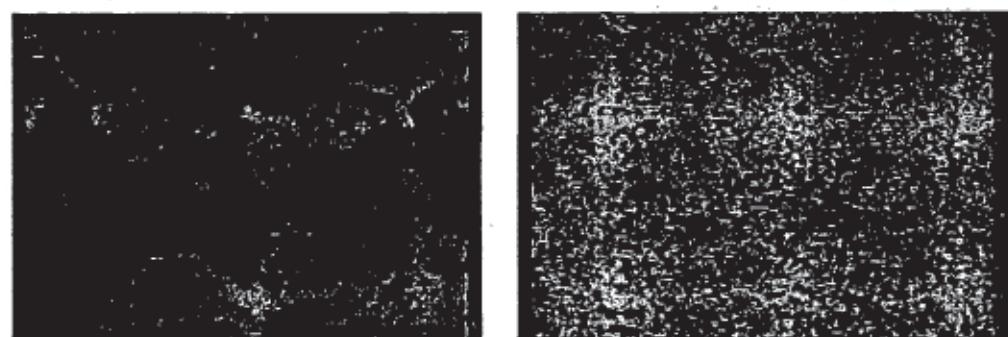


FIGURA 3H



Tiroides humano

FIGURA 3I

Bazo humano

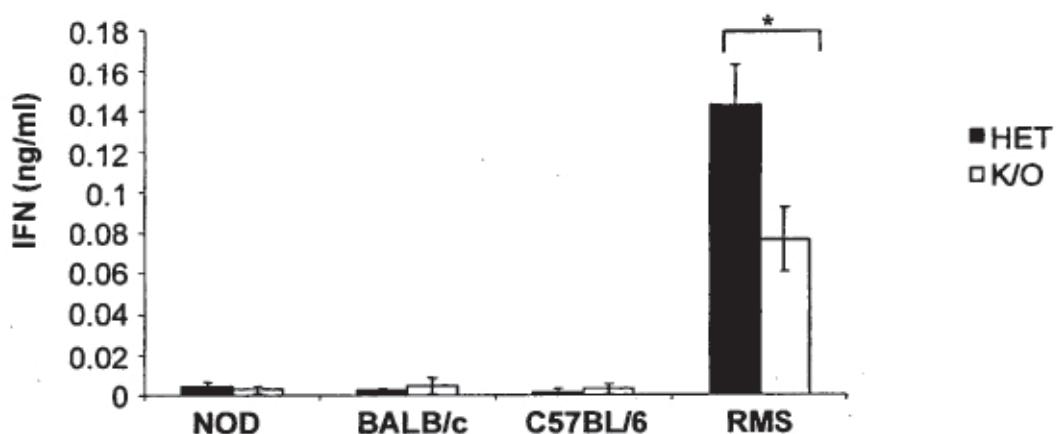


FIGURA 4A

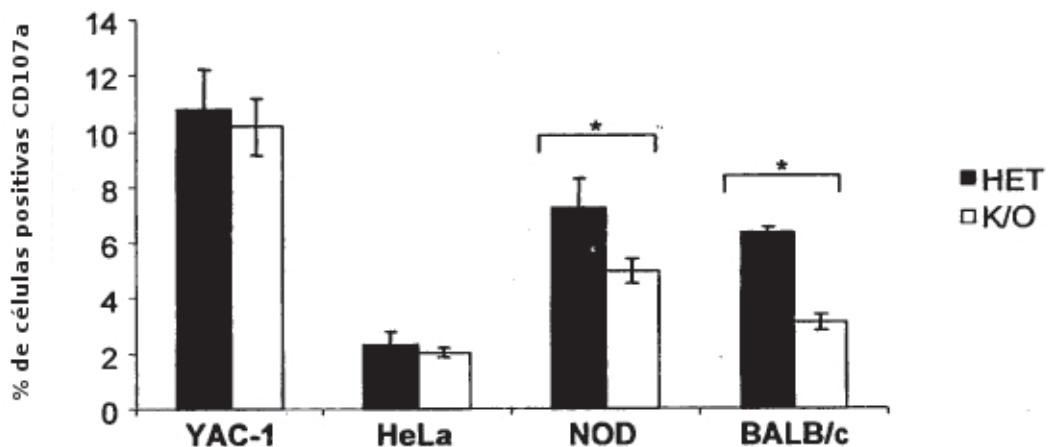


FIGURA 4B

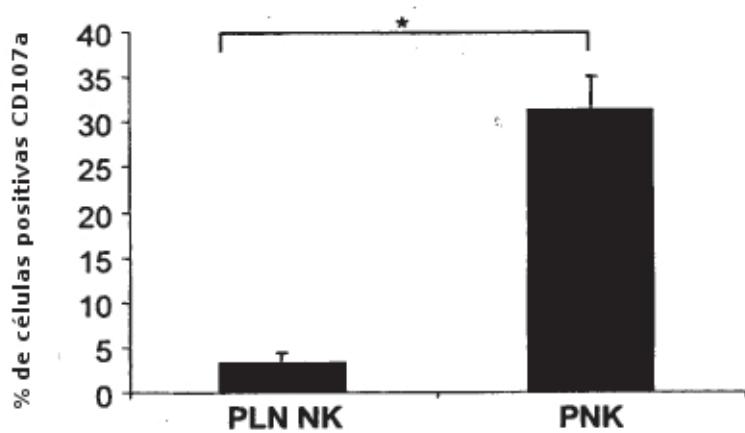
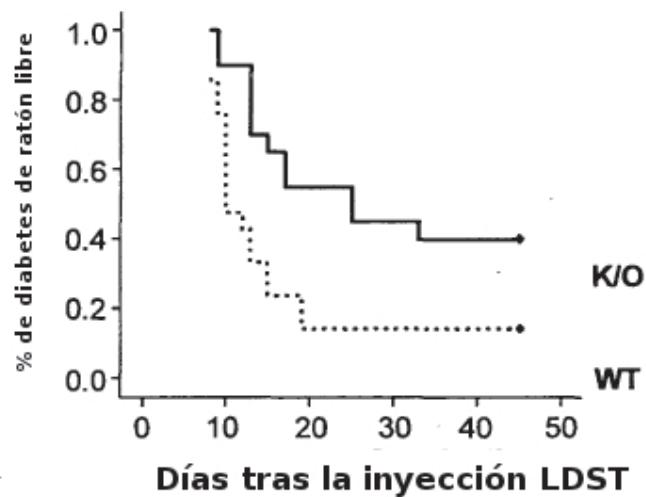
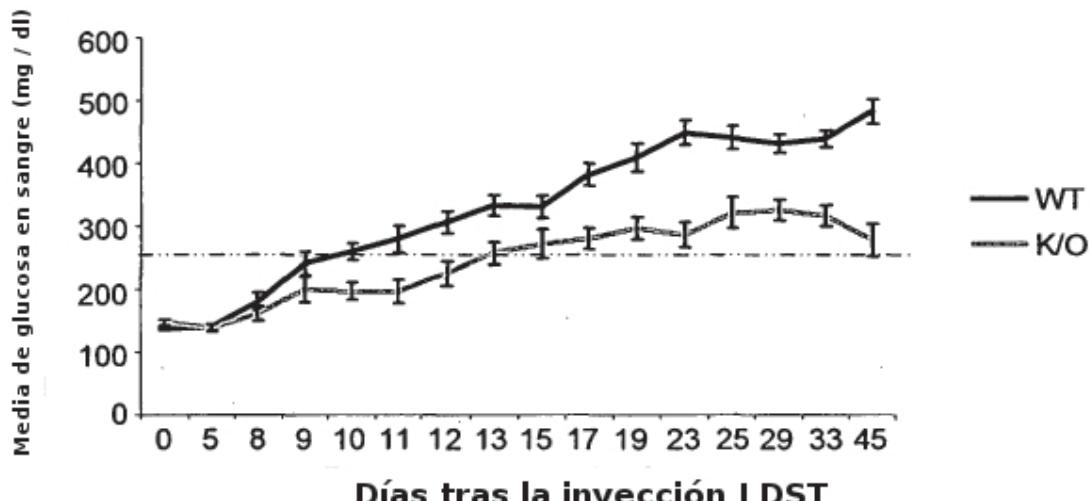
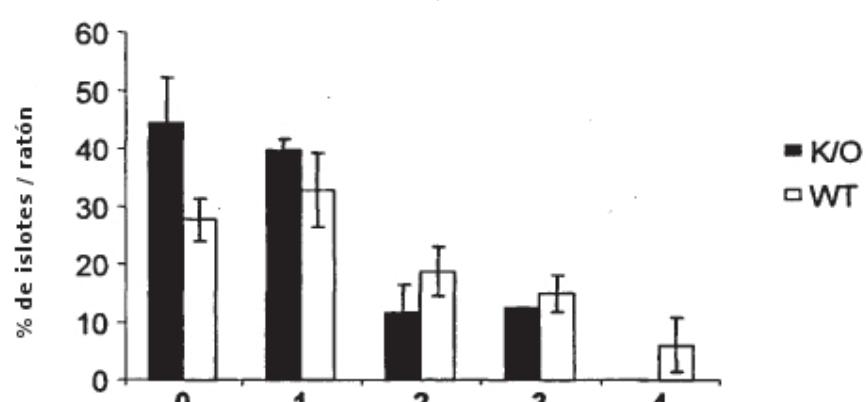
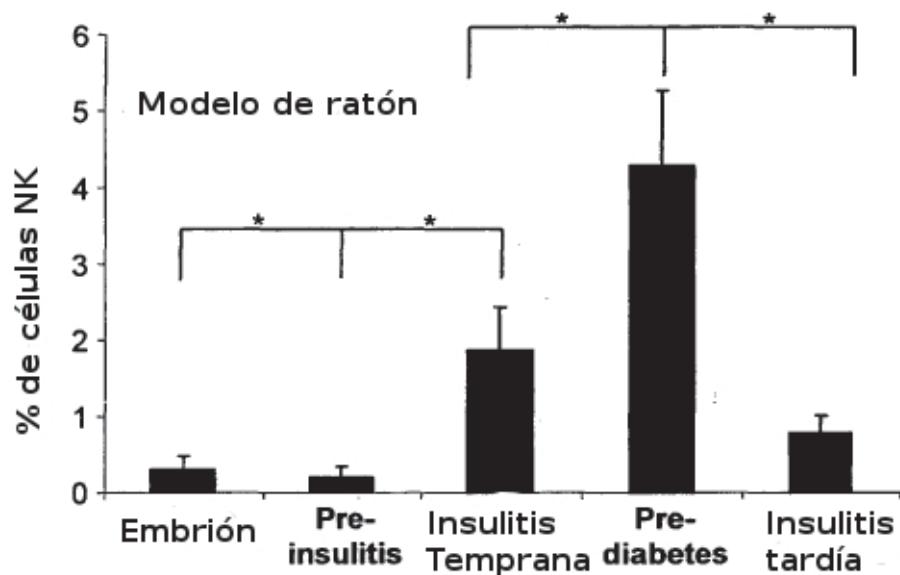
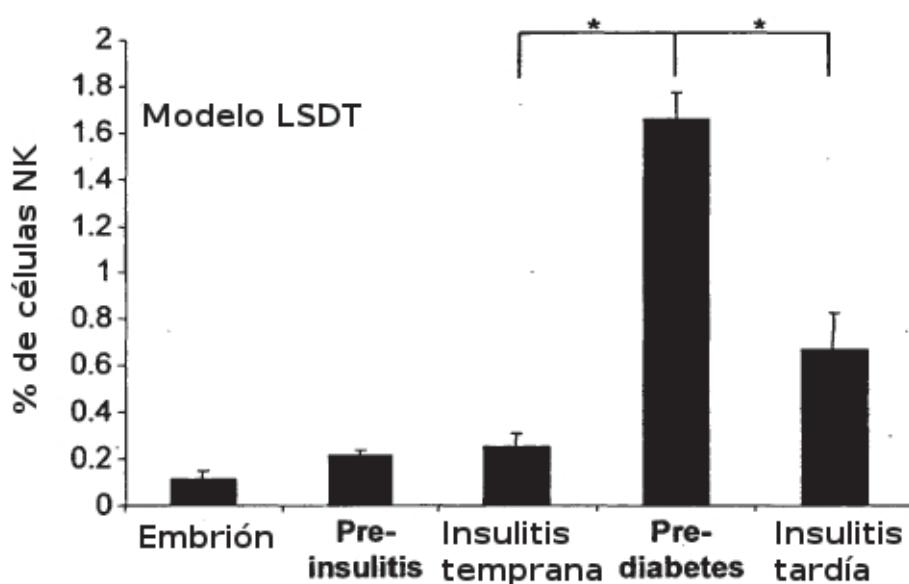
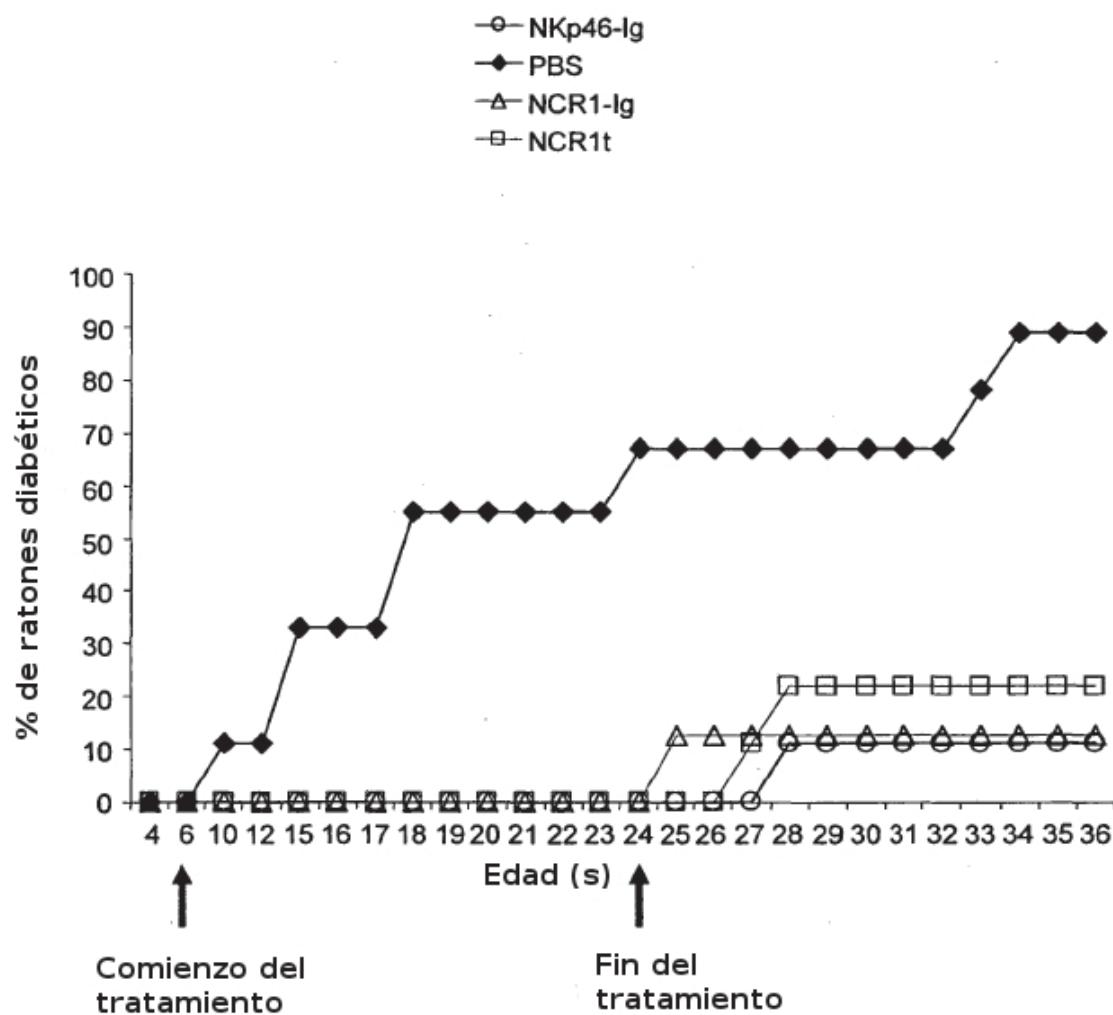


FIGURA 4C

**FIGURA 5A****FIGURA 5B****FIGURA 5C**

**FIGURA 6A****FIGURA 6B**

**FIGURA 7**

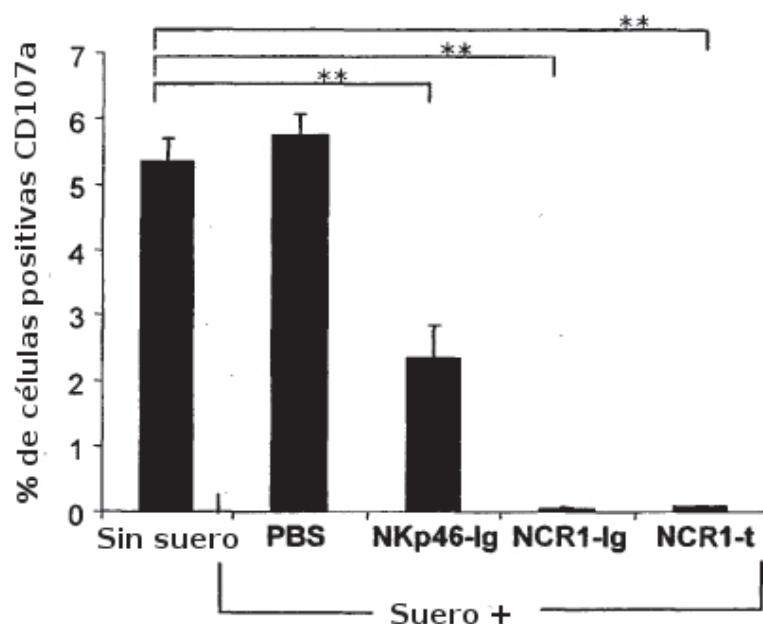


FIGURA 8A

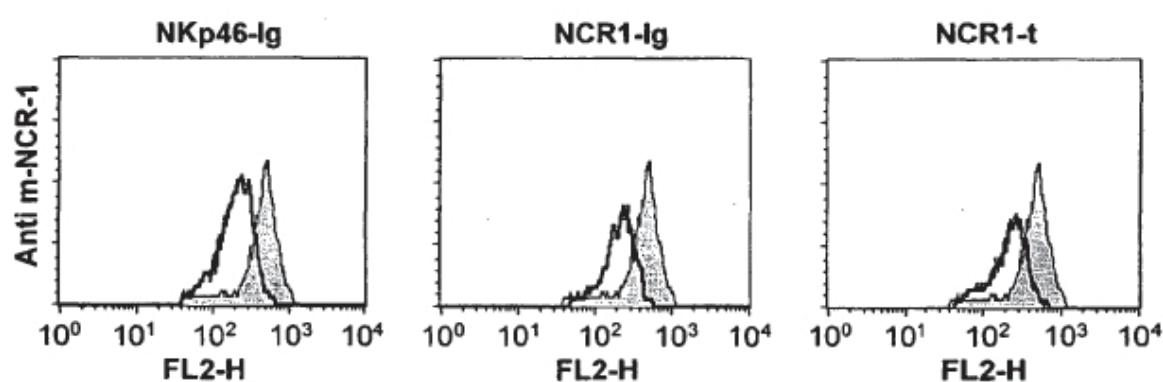


FIGURA 8B

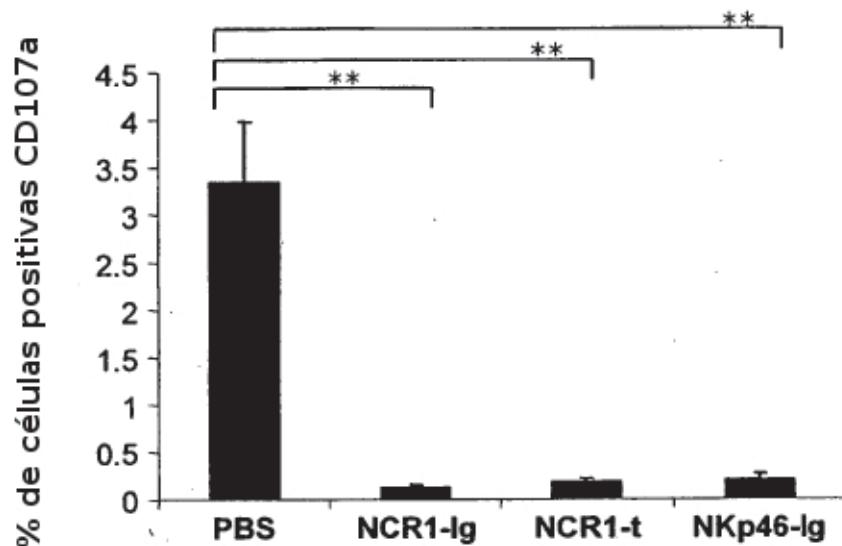


FIGURA 8C

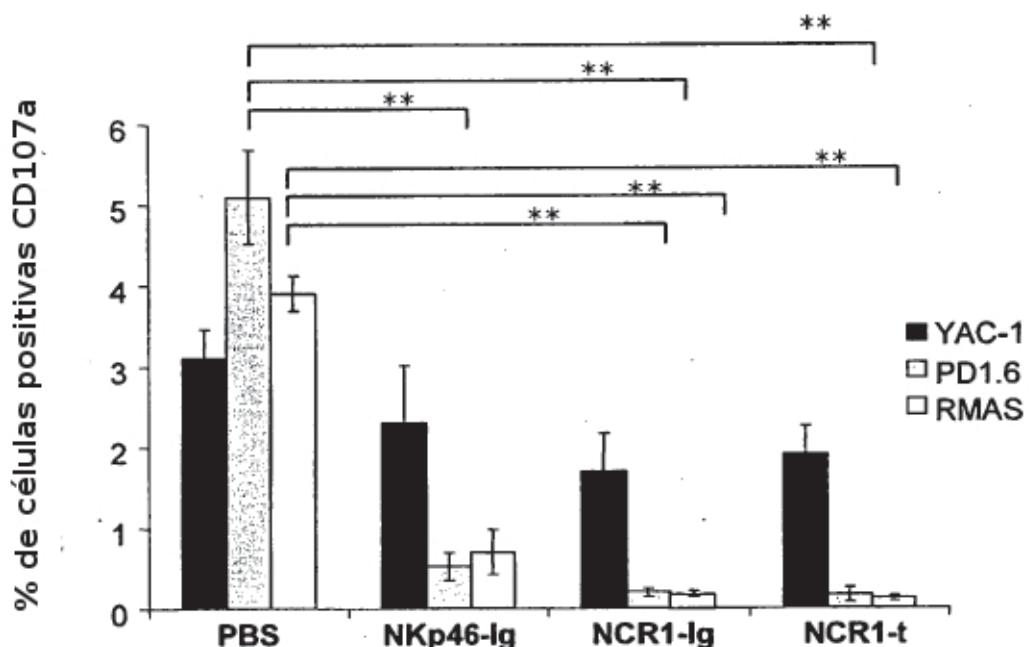
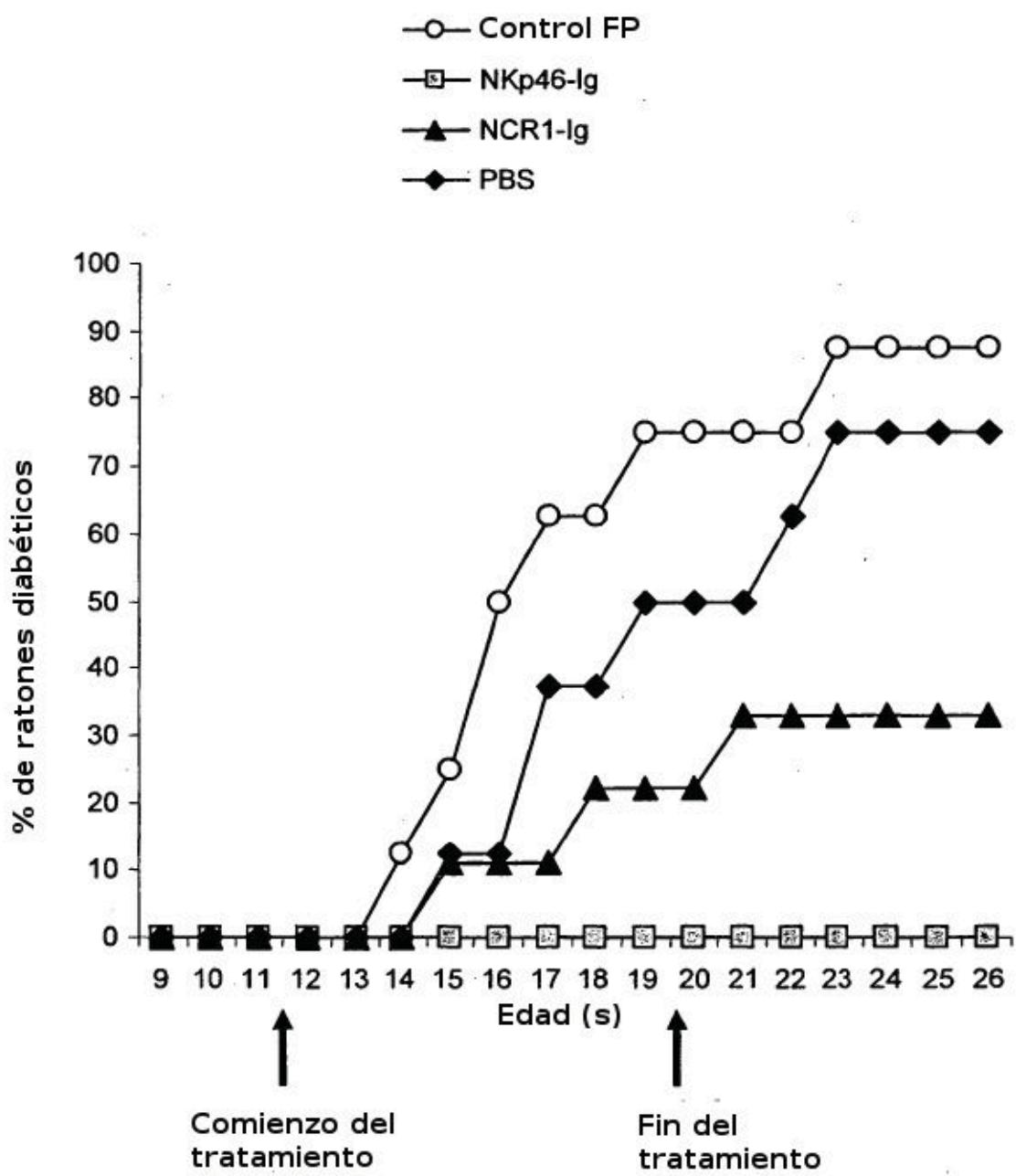


FIGURA 8D



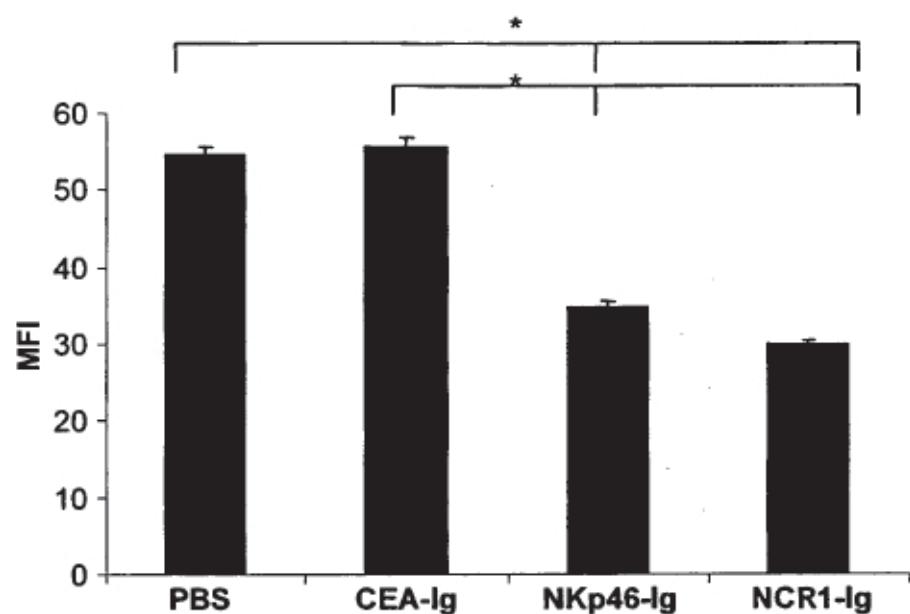


FIGURA 9B

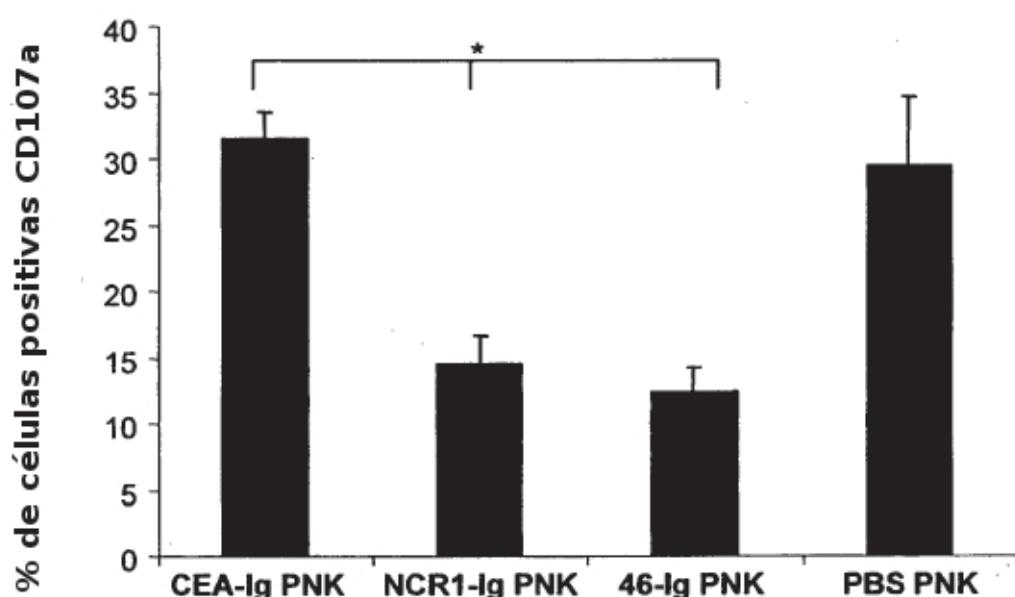


FIGURA 9C