

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 634**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 08771049 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2158210**

54 Título: **Proteínas de fusión de RAGE**

30 Prioridad:

14.06.2007 US 943994 P

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

28.03.2016

73 Titular/es:

**GALACTICA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
905 EXETER CREST
VILLANOVA, PA 19085, US**

72 Inventor/es:

**BLECK, GREGORY T. y
HILBERT, DAVID M.**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 564 634 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de RAGE

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere en general a productos finales de glicación avanzada ("AGE") y de forma más específica a ciertas proteínas de fusión que comprenden el receptor para productos finales de glicación avanzada ("RAGE"). Las proteínas de fusión de la invención se unen a AGE y otros ligandos de RAGE (por ejemplo, S100 y HMGB1) y composiciones que comprenden las proteínas de fusión de la invención se pueden usar para el tratamiento de enfermedades.

Antecedentes

[0002] Los productos finales de glicación avanzada (AGE) son el resultado de glicación no enzimática y oxidación de las proteínas. Aparecen en circunstancias relacionadas con el estrés, incluyendo en enfermedades autoinmunes del tejido conectivo, y se pueden formar en tejido inflamado debido a oxidación o la ruta de la mieloperoxidasa. AGE se ha relacionado con una serie de complicaciones relacionadas con la diabetes. Por ejemplo, los cambios estructurales característicos de la nefropatía diabética, engrosamiento de la membrana basal glomerular y expansión mesangial, van acompañados por acumulación de AGE, que conduce a glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial. La infusión prolongada de ratas no diabéticas con AGE ha llevado al desarrollo de cambios morfológicos similares y proteinuria significativa. Se ha demostrado que algunos inhibidores de AGE, tales como la aminoguanidina previenen la nefropatía diabética en modelos de animales diabéticos y se mostró recientemente que hacen lo mismo en un ensayo clínico en pacientes diabéticos. Además, los AGE son una diana terapéutica bien validada para retinopatía diabética. Amplios estudios en murino y rata diabéticos han demostrado el beneficio de la inhibición de la formación de AGE en el tratamiento de esta enfermedad.

[0003] La aterosclerosis se acelera de manera significativa en pacientes diabéticos y se asocia con un riesgo más elevado de mortalidad cardiovascular y cerebrovascular. Algunos estudios en animales y seres humanos han sugerido que los AGE desempeñan un papel significativo en la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas. El aumento de la acumulación de AGE en los tejidos vasculares diabéticos se ha asociado con cambios en la función de células endoteliales, macrófagos, y células del músculo liso.

[0004] Los AGE interactúan con receptores de la superficie celular en monocitos, macrófagos, células endoteliales de la microvasculatura, células del músculo liso, células mesangiales y neuronas. El receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas de receptores de la superficie celular. RAGE se compone de tres dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático que está implicado en la señalización. RAGE se une a múltiples ligandos además de AGE, incluyendo S100/calgranulinas, anfoterina/HMGB1, y fibrillas de amiloide. RAGE actúa a través de una cascada de señales que implica a NF- κ B. La expresión de RAGE se regula de forma positiva en presencia de ligandos de RAGE y está elevada en articulaciones de objetos con artritis reumatoide (RA).

[0005] RAGE tiene una isoforma secretada que carece de un dominio transmembrana denominado RAGE soluble (sRAGE). Se ha demostrado que la administración de sRAGE restablece la curación de heridas (Goova, *et al.* (2001) Am. J. Pathol. 159, 513-525) y suprime la aterosclerosis diabética (Park, *et al.* (1998) Nat Med. 4 (9): 1025-31). Las proteínas de fusión que consisten en un elemento de unión a ligando de RAGE y un elemento de inmunoglobulina se analizan en el documento WO 2004/016229 A2 (Wyeth, Madison, NJ) y en la Publicación de Sol. de Patente de Estados Unidos N.º 2006/0057679 A1 (O'Keefe, T. *et al.*). El documento US 2006/078562 también desvela proteínas de fusión que comprenden RAGE.

[0006] Existe una necesidad de nuevos métodos de tratamiento de enfermedades mediadas por AGE, tales como enfermedades que están asociadas con una cantidad elevada de AGE. Esta necesidad y otras se satisfacen con la presente invención.

55 **Sumario de la invención**

[0007] La presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende al menos un polipéptido que comprende: (a) una primera secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en los aminoácidos 1-301, los aminoácidos 24-301, los aminoácidos 1-344, o los aminoácidos 24-344 de la SEC ID N.º: 6, siendo la primera secuencia de aminoácidos capaz de unirse a un ligando de RAGE; y (b) una segunda secuencia de aminoácidos que es un dominio constante de inmunoglobulina IgG4 de cadena pesada humana. En una realización, una proteína de fusión de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEC ID N.º: 6 y la SEC ID N.º: 8. En una realización, una proteína de fusión aislada de la invención comprende la SEC ID N.º: 6 o la SEC ID N.º: 8. En otra realización, una proteína de fusión aislada de la invención consiste en la SEC ID N.º: 6. La presente invención también contempla moléculas de ácido nucleico (por

ejemplo, Moléculas de ADN o ARN) que codifican las proteínas de fusión de la invención así como células hospedadoras que expresan las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión de la invención.

[0008] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de la invención y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0009] La presente invención es útil en métodos para tratar enfermedades mediadas por AGE. Tales enfermedades incluyen cualquier enfermedad caracterizada por un aumento de la cantidad de AGE en un sujeto, por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano. Algunos métodos para el tratamiento de una enfermedad mediada por AGE comprenden la administración, a un sujeto que tiene una enfermedad mediada por AGE, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de la invención. Algunos ejemplos de enfermedades que se pueden tratar con tales métodos incluyen, pero no se limitan a, nefropatía diabética, artritis reumatoide, y enfermedades autoinmunes tales como dermatitis, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, uveítis, oftalmía, inflamación pulmonar autoinmune, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad ocular inflamatoria autoinmune, lupus sistémico eritematoso, resistencia a la insulina, artritis reumatoide, retinopatía diabética, y esclerodermia. En tales métodos se puede usar cualquier proteína de fusión de la invención. Los métodos se pueden poner en práctica usando una proteína de fusión que comprenden la SEC ID N°: 6 o la SEC ID N°: 8. En otra realización, los métodos de la invención se pueden poner en práctica usando una proteína de fusión que consiste en la SEC ID N°: 6.

[0010] La proteína de fusión de la presente invención es útil en métodos para reducir los niveles de ligando unido por RAGE en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) con necesidad de la misma, que comprende administrar al mamífero una cantidad que reduce el ligando de RAGE de una proteína de fusión de la invención.

[0011] En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un vector de expresión recombinante que comprende las secuencias de ADN de la invención; una célula hospedadora transformada, transducida, o transfectada con el vector; y un proceso para producir una proteína de fusión, que comprende el cultivo de una célula hospedadora transformada, transducida, o transfectada con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención en condiciones adecuadas para realizar la expresión de la proteína de fusión.

[0012] La presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden la proteína de fusión presente o fragmentos de la misma. En algunas realizaciones, la invención incluye composiciones que comprenden la proteína de fusión presente o fragmentos de la misma a la que se unen, directa o indirectamente, un radioisótopo, agente de quelación, toxina, fluorocromo, biotina, epítomos peptídicos tales como etiquetas de his, etiquetas de myc, o azúcares. Otras realizaciones de la divulgación incluyen la proteína de fusión presente fusionada con otra proteína para los fines de alteración de la vida media biológica o variantes de función y glicosilación de la proteína de fusión.

[0013] Estos y otros aspectos de la presente invención llegarán a ser evidentes después de hace referencia a la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

[0014]

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la leucostasis en a un modelo de ratón diabético inducido con estreptozotocina.

Las Figuras 2A-2D son gráficos de barras que muestran los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la permeabilidad vascular retiniana en diversas capas de retina en a un modelo de ratón diabético inducido con estreptozotocina.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la nitración de proteínas retinianas en a un modelo de ratón diabético inducido con estreptozotocina.

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la expresión en la retina de ICAM en a un modelo de ratón diabético inducido con estreptozotocina.

La Figura 5A es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en el número de capilares acelulares observados por mm cuadrado de tejido de retina en ratones diabéticos después de 10 meses de diabetes. La Figura 5B es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en el número de fantasmas pericíticos por 1000 células capilares observadas en ratones diabéticos después de 10 meses de diabetes.

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en un 50 % de respuesta al umbral de tacto en ratones diabéticos después de 10 meses de diabetes.

La Figura 7 proporciona un diagrama de flujo que muestra el protocolo experimental del Ejemplo 3.

La Figura 8 es un gráfico de líneas que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en los pesos de los animales de ensayo en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la incidencia de artritis en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en el inicio de artritis en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

La Figura 11 es un gráfico de líneas que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la incidencia de artritis como una función del tiempo en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

La Figura 12 es un gráfico de líneas que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la gravedad de la artritis como una función del tiempo en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

La Figura 13 es un gráfico de líneas que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en el número de patas artríticas observadas como una función del tiempo en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

Las Figuras 14A-14D son fotomicrografías que muestran los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la morfología de las articulaciones como una función del aumento de cantidades de la proteína de fusión en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

La Figura 15 es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en sinovitis (barras de color negro) y pannus (barras de color gris) en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

La Figura 16 es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en erosión marginal (barras de color negro) y cambios estructurales (barras de color gris) en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

La Figura 17 es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la puntuación total de artritis histológica en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

La Figura 18 es un gráfico de barras que muestra los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la pérdida de proteína en una matriz de la articulación en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

Las Figuras 19A-19D son fotomicrografías de secciones teñidas con azul de toluidina que muestran los efectos de una proteína de fusión de RAGE-Ig a modo de ejemplo en la pérdida de proteína de la matriz de la articulación en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno de tipo II.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

[0015] Como se usa en el presente documento, las expresiones "receptor para producto final de glicación avanzada" o RAGE se refiere a proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que son básicamente similares a las secuencias nativas de aminoácidos de RAGE de mamífero y funcionan para unir uno o más ligandos de RAGE de una manera específica de ligando-receptor. Las expresiones "producto final de glicación avanzada" y "AGE" se refieren a un grupo heterogéneo de moléculas formadas a partir de la reacción no enzimática de azúcares reductores con grupos amino libre de proteínas, líquidos y ácidos nucleicos como se ha descrito anteriormente.

[0016] Como se usa en el presente documento, un "dominio de unión a ligando de RAGE" o "RAGE-LBD" se refiere a cualquier proteína de RAGE de mamífero o cualquier parte de una proteína de RAGE de mamífero que retiene la capacidad de unirse a un ligando de RAGE de una manera específica de ligando-receptor. De forma específica, sin limitación, un dominio de unión a ligando de RAGE incluye un polipéptido que tiene uno o más dominios extracelulares de una proteína de RAGE transmembrana. Con referencia a la Tabla 6, un RAGE-LBD adecuado puede comprender al menos los aminoácidos 1-99, o los aminoácidos 24-99, o los aminoácidos 1-208, o los

aminoácidos 24-208, o los aminoácidos 1-301, o los aminoácidos 24-301, o los aminoácidos 1-344, o los aminoácidos 24-344 de la SEC ID N°: 6.

[0017] El término "aislado", como se usa en el contexto de la presente memoria descriptiva para definir la pureza de la proteína de fusión, se refiere a que la proteína está básicamente libre de otras proteínas con las que se asocia durante la producción, incluyendo sin limitación, básicamente libre de otras proteínas presentes durante la expresión de la proteína de fusión en un medio de cultivo celular. Por ejemplo, una proteína aislada de la invención puede comprender un 1-25 %, 20-25 %, 15-20 %, 10-15 %, 5-10 %, 1-5 % o menos de aproximadamente un 2 % en masa de restos de contaminantes de proteína de procesos de producción. Las composiciones que comprenden proteínas aisladas de la invención, sin embargo, pueden contener otras proteínas añadidas como estabilizantes, vehículos, excipientes o agentes coterapéuticos.

[0018] Como se usa en el presente documento, "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente.

[0019] Como se usa en el presente documento "tratamiento de" una enfermedad o trastorno se refiere a una mejora de al menos un signo o síntoma de la enfermedad o trastorno del sujeto.

[0020] La expresión "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). También se debería entender que la expresión incluye, como equivalentes, análogos de cualquiera de ARN o ADNc preparados a partir de análogos de nucleótido, y, cuando se pueda aplicar a la realización que se está describiendo, polinucleótidos mono (sentido o anti sentido) y bicatenario.

[0021] El término "o" se usa en el presente documento se usa para hacer referencia, y se usa indistintamente con, el término "y/o", a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

[0022] La expresión "porcentaje idéntico" se refiere a una identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. El porcentaje de identidad se puede determinar por comparación de una posición en cada secuencia que se puede alinear para fines de comparación. La expresión como un porcentaje de identidad se refiere a una función del número de aminoácidos o ácidos nucleicos idénticos en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Se pueden usar diversos algoritmos y/o programas de alineación, incluyendo FASTA, BLAST, o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como una parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), se pueden usar con, por ejemplo, ajustes por defecto. ENTREZ está disponible a través del Centro Nacional para Información Biotecnológica, Biblioteca Nacional de Medicina, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. En una realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias se puede determinar con el programa GCG con una ponderación de hueco de 1, por ejemplo, cada hueco de aminoácido se pondera como si fuera una sola falta de emparejamiento de aminoácido o nucleótido entre las dos secuencias.

[0023] La identidad de secuencia se puede determinar por comparación de una secuencia de referencia o una subsecuencia de la secuencia de referencia en una secuencia de ensayo (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos, una secuencia de aminoácidos, etc.). La secuencia de referencia y la secuencia de ensayo se alinean de forma óptima con respecto a un número arbitrario de restos denominado ventana de comparación. Para obtener la alineación óptima, en la secuencia de ensayo se pueden introducir adiciones o supresiones, tales como huecos. El porcentaje de identidad de secuencia se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las que está presente el mismo resto en ambas secuencias y dividiendo el número de posiciones de emparejamientos con la longitud total de las secuencias en la ventana de comparación y multiplicando por 100 para dar el porcentaje. Además del número de posiciones de emparejamiento, el número y tamaño de los huecos también se considera en el cálculo del porcentaje de identidad de secuencia.

[0024] Por lo general, la identidad de secuencia se determina usando programas informáticos. Un programa representativo es el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) accesible al público en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este programa compara segmentos en una secuencia de ensayo con secuencias en una base de datos para determinar la significancia estadística de los emparejamientos, a continuación identifica e informa solamente de esos emparejamientos que son más significativos que un nivel de umbral. Una versión adecuada del programa BLAST es una que permite huecos, por ejemplo, la versión 2.X (Altschul, *et al.*, *Nucleic Acids Res* 25 (17): 3389-402, 1997). Algunos programas adecuados adicionales para identificar proteínas con identidad de secuencia con respecto a las proteínas de la invención incluyen, pero no se limitan a, PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST, Zhang, *et al.*, *Nucleic Acids Res* 26 (17): 3986-90, 1998) y PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST, Altschul, *et al.*, *Nucleic Acids Res* 25 (17): 3389-402, 1997). Los programas están disponibles al público en la página web del NCBI mencionado anteriormente y se pueden usar con los ajustes por defecto para determinar la identidad de secuencia de acuerdo con la invención.

Proteínas de Fusión

[0025] La presente invención, como se define en las reivindicaciones, proporciona una proteína de fusión aislada

que comprende al menos un polipéptido que comprende: (a) una primera secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en los aminoácidos 1-301, los aminoácidos 24-301, los aminoácidos 1-344, o los aminoácidos 24-344 de la SEC ID N°: 6, siendo la primera secuencia de aminoácidos capaz de unirse a un ligando de RAGE; y (b) una segunda secuencia de aminoácidos que es un dominio constante de inmunoglobulina IgG4 de
5 cadena pesada humana.

[0026] Las proteínas de fusión de la invención, como se define en las reivindicaciones, pueden comprender una o más secuencias de aminoácidos además de un dominio de unión a ligando de RAGE y un dominio constante de IgG4. Por ejemplo, una proteína de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones puede comprender
10 una secuencia conectora que se puede insertar entre el dominio de unión a ligando de RAGE y la secuencia de IgG. Las proteínas de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones pueden comprender una o más secuencias de etiqueta, por ejemplo, secuencias de etiqueta de purificación tales como 6-Histidinas. Las proteínas de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones pueden comprender uno o más epítomos reconocidos por anticuerpos disponibles en el mercado, por ejemplo, c-myc (EQKLISEEDL, SEC ID N°: 9) y
15 hemaglutinina (YPYDVPDYA, SEC ID N°: 10) derivada de una etiqueta de epítopo de la proteína hemaglutinina de la gripe.

[0027] En la práctica de la invención se puede usar cualquier región de Fc de IgG adecuada como se define en las reivindicaciones, preferentemente, de una molécula de IgG4, por ejemplo, los restos 149-473 de aminoácidos del n.º
20 AAH25985 de registro en GenBank. Una región de IgG para uso en la presente invención puede ser una región de Fc de IgG4 y puede comprender una o más de las regiones CH2 y CH3 de la molécula de IgG4.

[0028] La Tabla 1 proporciona la secuencia de nucleótidos de una secuencia genética de proteína de fusión de Fc de RAGE-IgG4 humana.

25

Tabla 1: Secuencia Genética de Fusión Humana de Fc de RAGE-IgG4 (SEC ID N°: 1).

ATGGCAGCCGGAACAGCAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGTCTCAGTCTGTGGGGGGCAGTAGTAGGTGCTCA
AAACATCACAGCCCGGATTGGCGAGCCACTGGTGCTGAAGTGTAAGGGGGCCCCAAGAAACCACCCAGC
GGCTGGAATGGAAGTGAACACAGGCCGGACAGAAGCCTGGAAGGTCTGTCTCCCCAGGGAGGAGGCCCC
TGGGACAGTGTGGCTCGTGTCTTCCCAACGGCTCCCTCTTCCCTCCGGCTGTGGGATCCAGGATGAGGG
GATTTTCCGGTGCCAGGCAATGAACAGGAATGGAAGGAGACCAAGTCCAACCTACCGAGTCCGTGTCTACC
AGATTCTGGGAAGCCAGAAATTGTAGATTCTGCCCTGAACTCACGGCTGGTGTTCCCAATAAGGTGGGG
ACATGTGTGTCAGAGGGAAGCTACCCTGCAGGGACTCTTAGCTGGCACTTGGATGGGAAGCCCCCTGGTGCC
GAATGAGAAGGGAGTATCTGTGAAGGAACAGACCAGGAGACACCCTGAGACAGGGCTCTTCACACTGCAGT
CGGAGCTAATGGTGACCCAGCCCGGGGAGGAGATCCCCGTCCCACCTTCTCCTGTAGCTTCAGCCCAGGC
CTTCCCCGACACCGGGCCTTGCGCACAGCCCCATCCAGCCCCGTGTCTGGGAGCCTGTGCCTCTGGAGGA
GGTCCAATTGGTGGTGGAGCCAGAAGGTGGAGCAGTAGCTCCTGGTGGAAACCGTAACCCTGACCTGTGAAG
TCCCTGCCAGCCCTCTCCTCAAATCCACTGGATGAAGGATGGTGTGCCCTTGCCCTTCCCCCAGCCCT
GTGCTGATCCTCCCTGAGATAGGGCCTCAGGACCAGGGAACCTACAGCTGTGTGGCCACCCATTCCAGCCA
CGGGCCCCAGGAAAGCCGTGTCTGTCAGCATCAGCATCATCGAACCAGGCGAGGAGGGGCCAACTGCAGGCT
CTGTGGGAGGATCAGGGCTGGGAAGTCTAGCCCTGGCCGCTTCCACCAAGGGCCATCCGTCTTCCCCCTG
GCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACC
TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAATATGGTCCCCCATG
CCCATCATGCCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTCTCCCCCAAACCCAAGGACA
CTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTC
CAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAA
CAGCACGTACCGTGTGGTACAGTCTCACCCTGACCGTCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGA
GAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAA
GAGCCTCTCCCTGTCTCTCGGGAATGA

[0029] El texto en negrita es la secuencia de codificación para la secuencia señal de RAGE, el texto normal es la secuencia de codificación para RAGE humano, y el texto subrayado es la secuencia de codificación para la región 5 de Fc de IgG4.

Tabla 2: Secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión humana de Fc de RAGE-IgG4 (SEC ID N°: 2).

MAAGTAVGAW	VLVLSLWGA	VGAQNITARI	GEPLVLKCKG	APKKPPQRLE	50
WKLNTGRTEA	WKVLSPOGGG	PWDSVARVLP	NGSLFLPAVG	IQDEGIFRCQ	100
AMNRNGKETK	SNYRVRVYQI	PGKPEIVDSA	SELTAGVPNK	VGTCVSEGSY	150
PAGTLSWHLD	GKPLVPNEKG	VSVKEQTRRH	PETGLFTLQS	ELMVTFARGG	200
DRPRTFSCSF	SPGLPRHRAL	RTAPIQPRVW	EPVPLEEVQL	VVEPEGGAVA	250
PGGTVTLTCE	VPAQPSQIH	WMKDGVPLPL	PPSPVLILPE	IGPQDQGTYS	300
CVATHSSHGP	QESRAVSISI	IEPGEEGPTA	GSVGGSGLGT	LALAASTKGP	350
<u>SVFPLAPCSR</u>	<u>STSESTAALG</u>	<u>CLVKDYFPEP</u>	<u>VTVSWNSGAL</u>	<u>TSGVHTFPAV</u>	400
<u>LQSSGLYSLS</u>	<u>SVTVFPSSSL</u>	<u>GTKTYTCNVD</u>	<u>HKPSNTKVDK</u>	<u>RVESKYGPPC</u>	450
<u>PSCPAPFELG</u>	<u>GPSVFLFPPK</u>	<u>PKDTLMSRT</u>	<u>PEVTCVVVDV</u>	<u>SQEDPEVQFN</u>	500
<u>WYVDGVEVHN</u>	<u>AKTKPREEQF</u>	<u>NSTYRVVSVL</u>	<u>TVLHQDWLNG</u>	<u>KEYKCKVSNK</u>	550
<u>GLPSSIEKTI</u>	<u>SKAKGQPREP</u>	<u>QVYTLFPPSQE</u>	<u>EMTKNQVSLT</u>	<u>CLVKGFYPSD</u>	600
<u>IAVEWESNGQ</u>	<u>PENNYKTTP</u>	<u>VLDSDDGSFFL</u>	<u>YSRLTVDKSR</u>	<u>WQEGNVFSCS</u>	650
<u>VMHEALHNY</u>	<u>TQKSLSLSLG</u>	K			671

[0030] El texto en negrita es la secuencia de aminoácidos para la secuencia señal de RAGE, el texto normal es la secuencia de aminoácidos para RAGE humano, y el texto subrayado es la secuencia de aminoácidos para la región 5 Fc de IgG4.

Tabla 3: Secuencia Genética de Fusión Humana de Fc de RAGE-Conector -IgG4 (SEC ID N°: 3).

ATGGCAGCCGGAAACAGCAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGTCCCTCAGTCTGTGGGGGGCAGTAGTAGGTGCTCA
AAACATCACAGCCCGGATTGGCGAGCCACTGGTGTGAAGTGTAAGGGGGCCCCAAGAAACACCCACAGC
GGCTGGAATGGAACTGAACACAGGCCGGACAGAAGCCTGGAAGGTCCTGTCTCCCCAGGGAGGAGGCCCC
TGGGACAGTGTGGCTCGTGTCTTCCCAACGGCTCCCTCTTCCCTCCGGCTGTGGGATCCAGGATGAGGG
GATTTTCCGGTGCCAGGCAATGAACAGGAATGGAAAGGAGACCAAGTCCAACCTACCGAGTCCGTGTCTACC
AGATTCTGGGAAGCCAGAAATTGTAGATTCTGCCTCTGAACACACGGCTGGTGTTCCTCAATAAGGTGGGG
ACATGTGTGTGAGAGGAAGCTACCCTGCAGGGACTCTTAGCTGGCACTTGGATGGGAAGCCCCCTGGTGCC
GAATGAGAAGGGAGTATCTGTGAAGGAACAGACCAGGAGACACCCTGAGACAGGGCTCTTACACTGCAGT
CGGAGCTAATGGTGACCCAGCCCGGGGAGGAGATCCCCGTCCACCTTCTCCTGTAGCTTACAGCCAGGC
CTTCCCCGACACCGGGCCTTGCGCACAGCCCCATCCAGCCCCGTGTCTGGGAGCCTGTGCCTCTGGAGGA
GGTCCAATTGGTGGTGGAGCCAGAAGGTGGAGCAGTAGCTCCTGGTGGAAACCGTAACCCCTGACCTGTGAAG
TCCCTGCCAGCCCTCTCCTCAAATCCACTGGATGAAGGATGGTGTGCCCTTGCCCCCTCCCCCAGCCCT
GTGCTGATCCTCCCTGAGATAGGGCCTCAGGACCAGGGAACCTACAGCTGTGTGGCCACCCATTCCAGCCA
CGGGCCCCAGGAAAGCCGTGTGTGTCAGCATCAGCATCATCGAACCAGGCGAGGAGGGGCCAACTGCAGGCT
CTGTGGGAGGATCAGGGCTGGGAACCTAGCCCTGGCCGGTAGCGGCTCCGGAAGTGGGGCTTCCACCAAG
GGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA
CCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCCTGCCCTCCAGCAGC
TTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA
GTCCAAATATGGTCCCCATGCCATCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGACGTG
TCCCCCAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGACGTG
AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC
TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAA
CCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC
AGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
GCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTCGGGAAATGA

[0031] El texto en negrita es la secuencia de codificación a la secuencia señal de RAGE, el texto normal esta 10 secuencia de codificación para el RAGE humano, el texto con doble subrayado es la secuencia de codificación para

el conector peptídico, y el texto individual subrayado es la secuencia de codificación para la región de Fc de IgG4.

Tabla 4: Secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión humana de Fc de RAGE-Conector-IgG4 (SEC ID N°: 4).

MAAGTAVGAW	VLVLSLWGAV	VGAQNITARI	GEPLVLKCKG	APKKPPQRLE	50
WKLNTGRTEA	WKVLSPQGGG	PWDSVARVLP	NGSLFLPAVG	IQDEGIFRCQ	100
AMNRNGKETK	SNYRVRVYQI	PGKPEIVDSA	SELTAGVPNK	VGTCVSEGSY	150
PAGTLSWHLD	GKPLVPNEKG	VSVKEQTRRH	PETGLFTLQS	ELMVTPARGG	200
DPRPTFSCSF	SPGLPRHRAL	RTAPIQPRVW	EPVPLEEVQL	VVEPEGGAVA	250
PGGTVTLTCE	VPAQPSPQIH	WMKDGVPLPL	PPSPVLILPE	IGPODQGTYS	300
CVATHSSHGP	QESRAVSISI	IEPGEEGPTA	GSVGGSGLGT	<u>LALAGSGSGS</u>	350
<u>GASTKGPSVF</u>	<u>PLAPCSRSTS</u>	<u>ESTAALGCLV</u>	<u>KDYFPEPVTV</u>	<u>SWNSGALTSG</u>	400
<u>VHTFPAVLQS</u>	<u>SGLYSLSSVV</u>	<u>TVPSSSLGTK</u>	<u>TYTCNVDHKP</u>	<u>SNTKVDKRVE</u>	450
<u>SKYGPPCPSC</u>	<u>PAPEFLGGPS</u>	<u>VFLFPPKPKD</u>	<u>TLMISRTPEV</u>	<u>TCVVVDVSQE</u>	500
<u>DPEVQFNWYV</u>	<u>DGVEVHNAKT</u>	<u>KPREEQFNST</u>	<u>YRVVSVLTVL</u>	<u>HQDWLNGKEY</u>	550
<u>KCKVSNKGLP</u>	<u>SSIEKTISKA</u>	<u>KGQPREPOVY</u>	<u>TLPPSQEEMT</u>	<u>KNQVSLTCLV</u>	600
<u>KGFYPSDIAV</u>	<u>EWESNGOPEN</u>	<u>NYKTTTPVLD</u>	<u>SDGSFFLYSR</u>	<u>LTVDKSRWQE</u>	650
<u>GNVFSCSVMH</u>	<u>EALHNHYTQK</u>	<u>SLSLSLGK</u>			678

- 5 **[0032]** El texto en negrita es la secuencia de aminoácidos para la secuencia señal de RAGE, el texto normal es la secuencia de aminoácidos para RAGE humano, el texto con doble subrayado es la secuencia de aminoácidos para el conector peptídico, y el texto individual subrayado es la secuencia de aminoácidos para la región de Fc de IgG4.

Tabla 5: Secuencia Genética de Fusión Humana de Fc de variante de RAGE-IgG4 (SEC ID N°: 5).

ATGGCAGCCGGAACAGCAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGTCCCTCAGTCTGTGGGGGGCAGTAGGTGCTCAAAAC
ATCACAGCCCGGATTGGCGAGCCACTGGTGCTGAAGTGTAAGGGGGCCCCAAGAAACCACCCAGCGGCTGGAA
TGGAAACTGAACACAGGCCGGACAGAAGCTTGAAGGTCTGTCTCCCCAGGGAGGAGGCCCTGGGACAGTGTG
GCTCGTGTCTTCCCAACGGCTCCCTCTTCCCTCCGGCTGTTCGGGATCCAGGATGAGGGGATTTTCCGGTGCCAG
GCAATGAACAGGAATGGAAAGGAGACCAAGTCCAACCTACCGAGTCCGTGTCTACCAGATTCTGGGAAGCCAGAA
ATTGTAGATTCTGCCTCTGAACTCACGGCTGGTGTTCCCAATAAGGTGGGGACATGTGTGTGTCAGAGGGAAGCTAC
CCTGCAGGGACTCTTAGCTGGCACTTGGATGGGAAGCCCTGGTGC GAATGAGAAGGGAGTATCTGTGAAGGAA
CAGACCAGGAGACACCCTGAGACAGGGCTCTTCACACTGCAGTCGGAGCTAATGGTGACCCAGCCCGGGGAGGA
GATCCCCGTCCCACCTTCTCCTGTAGCTTCAGCCAGGCCTTCCCCGACGCCGGCCTTGCAACAGCCCCCATC
CAGCCCCGTGTCTGGGAGCCTGTGCCTCTGGAGGAGGTCCAATTGGTGGTGGAGCCAGAAGGTGGAGCAGTAGCT
CCTGGTGGAAACCGTAACCCTGACCTGTGAAGTCCCTGCCAGCCCTCTCCTCAAATCCACTGGATGAAGGATGGT
GTGCCCTTGCCCTTCCCCCAGCCCTGTGCTGATCCTCCCTGAGATAGGGCCTCAGGACCAGGGAACCTACAGC
TGTGTGGCCACCAATCCAGCCACGGGCCCCAGGAAAGCCGTGCTGTGTCAGCATCAGCATCATCGAACCAGGCGAG
GAGGGGCCAACTGCAGGCTCTGTGGGAGGATCAGGGCTGGGAACTCTAGCCCTGGCCGCTTCCACCAAGGGCCCA
TCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC
TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCCTGCACACCTTCCCGGCTGTG
CTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTAC
ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGC
CCATCATGCCAGCACCTGAGTTCCCTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTC
ATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAC
TGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
GGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTG
CCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGAC
GGCTCCTTCTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTCGGGAAATGA

[0033] El texto en negrita es la secuencia de codificación para la secuencia señal de RAGE, el texto normal es la secuencia de codificación para variante de RAGE humano, las letras con subrayado ondulado en negrita son sitios de las mutaciones puntuales introducidas en la secuencia de hRAGE variante, y el texto subrayado es la secuencia de codificación para la región Fc de IgG4.

Tabla 6: Secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión humana de Fc de variante de RAGE-IgG4 (SEC ID N°: 6).

1 MAAGTAVGAW VLVL~~SL~~WGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 51 WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 101 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 151 PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 201 DPRPTFSCSF SPGLPRRRAL HTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 251 PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSVLILPE IGPQDQGTYS
 301 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALAASTKGP
 351 SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTSVWNSGAL TSGVHTFPAV
 401 LQSSGLYSL SVTVPSSSL GTKTYTCNVD HKPSNTKVDK RVESKYGPPC
 451 PSCPAPEFLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVT CVVVDV SOEDPEVQFN
 501 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
 551 GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
 601 IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSGDFFL YSR~~L~~TVDKSR WQEGNVFSCS
 651 VMHEALHNHY TQKSLSLSLG K

[0034] El texto en negrita es la secuencia de aminoácidos para la secuencia señal de RAGE, el texto normal es la secuencia de aminoácidos para variante de RAGE humano, las letras con subrayado ondulado en negrita son sitios de mutaciones puntuales introducidas en la variante de hRAGE, y el texto subrayado es la secuencia de aminoácidos para la región Fc de IgG4.

Tabla 7: Secuencia Genética de Fusión Humana de Fc de variante de RAGE -Conector-IgG4 (SEC ID N°: 7).

ATGGCAGCCGGAACAGCAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGTCCCTCAGTCTGTGGGGGGCAGTAGTAGGTGCTCAAAAC
ATCACAGCCCGGATTGGCGAGCCACTGGTGCTGAAGTGTAAGGGGGCCCCAAGAAACCACCCAGCGGCTGGAA
TGGAAACTGAACACAGGCCGGACAGAAGCTTGGAAAGGTCCGTGTCTCCCAGGGAGGAGGCCCTGGGACAGTGTG
GCTCGTGTCTTCCCAACGGCTCCCTCTTCCTTCCGGCTGTGGGATCCAGGATGAGGGGATTTTCCGGTGCCAG
GCAATGAACAGGAATGGAAAGGAGACCAAGTCCAACCTACCAGTCCGTGTCTACCAGATTCTGGGAAGCCAGAA
ATTGTAGATTCTGCCTCTGAACTCACGGCTGGTGTTCCTAATAAGGTGGGGACATGTGTGTGTCAGAGGGAAGCTAC
CCTGCAGGGACTCTTAGCTGGCACTTGGATGGGAAGCCCCCTGGTGCCGAATGAGAAGGGAGTATCTGTGAAGGAA
CAGACCAGGAGACACCCTGAGACAGGGCTCTTCACACTGCAGTCGGAGCTAATGGTGACCCAGCCCGGGGAGGA
GATCCCCGTCCACCTTCTCCTGTAGCTTCAGCCCAGGCCCTCCCCGACCGGGCCTTGCACACAGCCCCCATC
CAGCCCCGTGTCTGGGAGCCTGTGCCCTTGAGGAGGTCCAATTGGTGGTGGAGCCAGAAGGTGGAGCAGTAGCT
CCTGGTGGAAACCGTAACCTGACCTGTGAAGTCCCTGCCAGCCCTCTCCTCAAATCCACTGGATGAAGGATGGT
GTGCCCTTGCCCTTCCCCCAGCCCTGTGCTGATCCTCCCTGAGATAGGGCCTCAGGACCAGGGAACCTACAGC
TGTGTGGCCACCCATCCAGCCACGGGCCCCAGGAAAGCCGTGTGTGTCAGCATCAGCATCATCGAACAGGGCAG
GAGGGGCCAACTGCAGGCTCTGTGGGAGGATCAGGGCTGGGAACCTAGCCCTGGCCGGTAGCGGCTCCGGAAGT
GGGGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
AGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAG
TCCAAATATGGTCCCCCATGCCATCATGCCAGCACCTGAGTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTCTGTCCCC
CCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAA
GACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTACAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCAG
CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAG
GGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CTCGGGAATGA

5 **[0035]** El texto en negrita es la secuencia de codificación para la secuencia señal de RAGE, el texto normal es la secuencia de codificación para variante de RAGE humano, las letras con subrayado ondulado en negrita son sitios de las mutaciones puntuales introducidas en la secuencia de hRAGE variante, el texto con doble subrayado es la secuencia que codifica un conector peptídico, y el texto subrayado es la secuencia de codificación para la región Fc de IgG4.

Tabla 8: secuencia de aminoácidos de Fc humana de variante de RAGE -Conector-IgG4 (SEC ID N°: 8).

1	MAAGTAVGAW	VLVLSLWGAV	VGAQNITARI	GEPLVLKCKG	APKKPPQRLE
51	WKLNTGRTEA	WKVLSPOGGG	PWDSVARVLP	NGSLFLPAVG	IQDEGIFRCQ
101	AMNRNGKETK	SNYRVRVYQI	PGKPEIVDSA	SELTAGVPNK	VGTCVSEGSY
151	PAGTLSWHL D	GKPLVPNEKG	VSVKEQTRRH	PETGLFTLQS	ELMVTPARGG
201	DPRPTFSCSF	SPGLPRRAL	HTAPIQPRVW	EPVPLEEVQL	VVEPEGGAVA
251	PGGTVTLTCE	VPAQPSPQIH	WMKDGVPLPL	PPSPVLILPE	IGPQDQGTYS
301	CVATHSSHGP	QESRAVSISI	IEPGEEGPTA	GSVGGSGLGT	LALAGSGSGS
351	GASTKGPSVF	PLAPCSRSTS	ESTAALGCLV	KDYFPEPVTV	SWNSGALTSG
401	VHTFPAVLQS	SGLYSLSSVV	TVPSSSLGTK	TYTCNVDHKE	SNTKVDKRVE
451	SKYGPPCPSC	PAPEFLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSQE
501	DPEVQFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQFNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY
551	KCKVSNKGLP	SSI EKTISKA	KGQPREPOVY	TLPPSQEEMT	KNQVSLTCLV
601	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPPVL D	SDGSFFLYSR	LTVDKSRWQE
651	GNVFCSVMH	EALHNHYTQK	SLSLSLGK		

[0036] El texto en negrita es la secuencia de aminoácidos para la secuencia señal de RAGE, el texto normal es la secuencia de aminoácidos para variante de RAGE humano, las letras con subrayado ondulado en negrita son sitios de las mutaciones puntuales introducidas en la variante de hRAGE, el texto con doble subrayado es la secuencia de aminoácidos para el conector peptídico, y el texto subrayado es la secuencia de aminoácidos para la región Fc de IgG4.

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE RAGE

10

[0037] Las proteínas de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones se pueden producir en cualquier sistema de expresión de proteínas conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, sistemas de expresión eucariotas, sistemas de expresión bacteriana, y sistemas de expresión virales. Una diversidad de sistemas de vector de expresión en hospedador se puede usar para expresar la proteína de fusión de la invención. Tales sistemas hospedadores representan vehículos en los que se pueden producir las proteínas de fusión de la invención y a partir de los que se pueden purificar posteriormente. Tales sistemas incluyen, pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias, levaduras, células de insecto, o células de plantas. RAGE expresado en sistemas de expresión de levadura o de mamífero, por ejemplo, células COS-7, puede tener un peso molecular y patrón de glicosilación similar o ligeramente diferente al de las moléculas nativas, dependiendo del sistema de expresión. La expresión de los ADN de RAGE en bacterias tales como *E. coli* proporciona moléculas no glicosiladas. Se pueden obtener patrones de glicosilación diferentes usando sistemas de expresión de baculovirus en células de insecto. Los análogos mutantes funcionales de RAGE de mamífero que tiene inactivados los sitios de N-glicosilación pueden ser producidos se pueden producir mediante síntesis y ligación de oligonucleótidos o mediante técnicas de mutagénesis específica de sitio.

25

[0038] Estas proteínas análogas se pueden producir en una forma reducida en carbohidratos, homogénea con un buen rendimiento usando sistemas de expresión de levadura.

[0039] Con cualquier método conocido en la técnica se pueden obtener moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones, y se puede determinar la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos. En vista de las enseñanzas en el presente documento y las secuencias conocidas de polipéptidos de RAGE y sus elementos de unión a ligando identificados o identificables, y las secuencias conocidas para dominios constantes de IgG de cadena pesada, se pueden determinar secuencias de nucleótidos que codifican estos polipéptidos usando métodos bien conocidos en la técnica, es decir, los codones de nucleótidos conocidos porque codifican los aminoácidos en particular se pueden ensamblar de una manera tal como para generar un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención. Algunos codones de nucleótidos se pueden seleccionar basándose en el sistema de expresión usado, por ejemplo, mediante selección de codones que corresponden a moléculas de ARNt más abundantes presentes en el sistema de expresión, se puede expresar un nivel de proteína de fusión más elevado. Tal polinucleótido que codifica la proteína de fusión se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos sintetizados de forma química (por ejemplo como se describe en Kutmeier *et al.*, *Biotechniques* 17: 242 (1994), que, en resumen, implica la síntesis de oligonucleótidos de superposición que contienen partes de la secuencia que codifica la proteína de fusión, hibridación y ligadura de esos oligonucleótidos, y a continuación amplificación de los oligonucleótidos ligados por reacción o reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).

45

[0040] La expresión recombinante de una proteína de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones (incluyendo otras moléculas que comprenden, o que como alternativa consiste en fragmentos de proteínas de fusión o variantes de los mismos) puede requerir la construcción de un vector o vectores de expresión que contienen un polinucleótido que codifica la proteína de fusión. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención, el vector o vectores para la producción de la proteína de fusión se pueden producir con tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Tales vectores de expresión que contienen secuencias de codificación de RAGE-Fc también pueden contener señales/secuencias apropiadas de control de transcripción y traducción, por ejemplo, sitios de unión a ribosomas (es decir, secuencias de Kozak), sitios de entrada de ribosoma interno (IRES), y sitios de poliadenilación, etc.

[0041] Las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones se pueden transferir a células de mamífero utilizando vectores retrovirales de replicación defectuosa (por ejemplo, vectores derivados de virus de leucemia murina de Moloney (MLV) o VIH) y se pueden formar pseudotipos con la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) para insertar de forma estable copias individuales de moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína de fusión de la invención en células en división. Los vectores retrovirales entregan genes codificados como ARN que, después de entrar en la célula, se transcriben de forma inversa a ADN y se integran de forma estable en el genoma de la célula hospedadora. Inserciones de múltiples genes en una sola célula pueden aumentar la expresión y secreción de la proteína de fusión. Múltiples bandas de infección también pueden aumentar el número de copias de genes integrados y por lo tanto la cantidad de proteína de fusión expresada. El gen o genes integrados que codifican la proteína de fusión se mantienen en las células a través de división celular en virtud de su presencia en el genoma.

[0042] En algunas realizaciones, la presente invención tal como se define en las reivindicaciones proporciona una línea celular estable que expresa las proteínas de fusión de la invención. Un método adecuado para la generación rápida de líneas celulares de mamífero que expresan alto contenido de proteína, estables se está usando en el sistema de expresión GPEX™ (Gala Biotech, una unidad de negocio de Catalent Pharma Solutions, Middleton WI., Bleck, Gregory T., *Bioprocessingjournal.com* septiembre/octubre de 2005 p1-7). Tal método puede implicar la producción de un vector retroviral defectuoso de replicación, pseudotipado basado en MMLV y transducción de células de mamífero (por ejemplo, células CHO) con el vector. El vector se puede integrar en el genoma de las células produciendo de este modo una línea celular estable

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE FUSIÓN AISLADA

[0043] Algunas proteínas de fusión aisladas de la invención se pueden preparar por cultivo de sistemas adecuados de hospedador/vector para expresar los productos de traducción recombinante de las secuencias de ADN presentes, que a continuación se purifican a partir de medios de cultivo o extractos celulares usando técnicas bien, en la técnica.

[0044] Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medios de cultivo se pueden concentrar primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, un una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender, por ejemplo, un AGE o lectina o Proteína A o Proteína G o molécula de anticuerpo unida a un soporte adecuado. Como alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos colgantes de dietilaminoetilo (DEAE). Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados normalmente en purificación de proteínas. Como alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Algunos intercambiadores de cationes adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Los grupos sulfopropilo son preferentes.

[0045] La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano se aísla normalmente mediante extracción inicial a partir de sedimentos celulares, seguido de una o más etapas de cromatografía de intercambio iónico o de exclusión por tamaño acuosas, de precipitación de proteínas, de concentración. Por último, se puede emplear cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de RAGE de mamífero recombinante se pueden romper con cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o uso de agentes de lisis celular.

[0046] La fermentación de levadura que expresa la proteína de fusión de la invención como una proteína secretada simplifica la purificación en gran medida. La proteína recombinante secretada que resulta de una fermentación a gran escala se puede purificar con métodos análogos a los divulgados en Urdal *et al.*, (*J. Chromatog* 296:171, 1984). Esta referencia describe dos etapas de HPLC de fase inversa secuenciales para la purificación de GMCSF humano recombinante en una columna de HPLC preparativa.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

[0047] Las proteínas de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones se pueden formular de una manera adecuada para administración a un sujeto con necesidad de las mismas, por ejemplo, se pueden formular

como composiciones farmacéuticas. Las composiciones de la invención pueden comprender uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. En una realización, el vehículo es adecuado para administración parenteral. Un vehículo puede ser adecuado para administración en el sistema nervioso central (por ejemplo, por vía intraespinal o por vía intracerebral). Como alternativa, el vehículo puede ser adecuado para administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. En otra realización, el vehículo es adecuado para administración oral. Algunos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las proteínas de fusión de la invención, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. En las composiciones también se pueden incorporar algunos compuestos activos complementarios.

[0048] Los vehículos adecuados por lo general no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Habitualmente, la preparación de composiciones farmacéuticas de la invención implica la combinación de la proteína de fusión de la invención con uno o más de tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos que incluyen glucosa, trehalosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. La solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero específica son algunos ejemplos de diluyentes apropiados.

ADMINISTRACIÓN TERAPÉUTICA DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE LA INVENCION

[0049] Las proteínas de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la invención y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, en particular un ser humano) con necesidad de las mismas. Tales composiciones pueden ser útiles en un método para tratar enfermedades humanas.

[0050] Por lo general, los métodos comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de fusión de la invención. La cantidad farmacéuticamente eficaz empleada puede variar de acuerdo con factores tales como patología, edad, sexo y peso del individuo.

[0051] Una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones puede ser de aproximadamente 1 µg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 10 µg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 100 µg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 1 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 10 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 100 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 100 µg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 25 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 1 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 25 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 5 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 25 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 10 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 25 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 15 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 25 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 100 µg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 1 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 2,5 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 5 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 10 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o de aproximadamente 7,5 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto.

[0052] Una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones puede ser 0,5 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, 1 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, 2 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, 3 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, 4 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, 5 mg de

proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, 6 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, 7 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, 8 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, 9 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto, o 10 mg de proteína de fusión/1 kg de peso corporal de sujeto.

5

[0053] Una forma de dosificación unitaria se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de la proteína de fusión de la invención calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Una forma de dosificación unitaria de una proteína de fusión de la invención como se define en las reivindicaciones puede ser de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 mg, o de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 500 mg. Una dosis unitaria de una proteína de fusión de la invención puede ser de aproximadamente 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, o 700 mg.

[0054] Las composiciones de la invención como se define en las reivindicaciones pueden comprender proteínas de fusión de la invención a un nivel de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente 20 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 18 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 16 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 14 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 12 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 10 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 8 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 6 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 4 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 2 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 1 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 0,9 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 0,8 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 0,7 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 0,6 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 0,5 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 0,4 % en peso, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 0,3 % en peso, o de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 0,2 % en peso del peso total de la composición.

[0055] Las composiciones farmacéuticas de la invención como se define en las reivindicaciones pueden comprender una o más proteínas de fusión de la invención a un nivel de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 20 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 18 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 16 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 14 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 12 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 10 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 9 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 8 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 7 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 6 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 5 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 4 % en peso, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 3 % en peso, o de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 2 % en peso del peso total de la composición. Las composiciones farmacéuticas de la invención como se define en las reivindicaciones pueden comprender una o más proteínas de fusión de la invención a un nivel de aproximadamente un 0,1 % en peso, aproximadamente un 0,2 % en peso, aproximadamente un 0,3 % en peso, aproximadamente un 0,4 % en peso, aproximadamente un 0,5 % en peso, aproximadamente un 0,6 % en peso, aproximadamente un 0,7 % en peso, aproximadamente un 0,8 % en peso, aproximadamente un 0,9 % en peso, aproximadamente un 1 % en peso, aproximadamente un 2 % en peso, aproximadamente un 3 % en peso, aproximadamente un 4 % en peso, aproximadamente un 5 % en peso, aproximadamente un 6 % en peso, aproximadamente un 7 % en peso, aproximadamente un 8 % en peso, o aproximadamente un 9 % en peso basándose en el peso total de la composición.

55

[0056] Algunos regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar de forma proporcional según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. La formulación de composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación es especialmente ventajosa para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Las composiciones de la invención como se define en las reivindicaciones se pueden formular y administrar por vía intravenosa, intramuscular, o subcutánea. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención como se define en las reivindicaciones se pueden administrar por vía subcutánea o por vía intramuscular.

[0057] En algunas realizaciones un régimen de dosificación puede implicar la administración de dosis repetidas, por

ejemplo, la administración de una dosis semanal. Los regímenes de tratamiento pueden implicar una dosis semanal durante un periodo de tiempo (por ejemplo, durante cuatro semanas) seguido de un régimen de dosificación de "mantenimiento" menos frecuente (por ejemplo, un mes al mes o una vez cada dos meses). Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para conseguir los resultados terapéuticos deseados.

5

[0058] Los métodos que se describen en el presente documento incluyen métodos para suprimir respuestas inflamatorias dependientes de AGE en seres humanos, que comprenden la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas de fusión de la invención.

10 **[0059]** Los métodos que se describen en el presente documento incluyen métodos para inhibir la actividad biológica mediada por AGE que comprenden la administración de una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas de fusión de la invención. Como se ha analizado anteriormente, AGE se ha implicado en una diversidad de enfermedades o afecciones tales como enfermedades autoinmunes. Algunos trastornos, enfermedades o afecciones autoinmunes que se pueden tratar, mejorar, detectar, diagnosticar, pronosticar o seguir usando la proteína de fusión

15 de la invención incluyen, pero no se limitan a, dermatitis, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, uveítis, oftalmía, inflamación pulmonar autoinmune, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad ocular inflamatoria autoinmune, lupus sistémico eritematoso, resistencia a la insulina, artritis reumatoide, retinopatía diabética, y esclerodermia.

20 **[0060]** Otros trastornos que se pueden tratar o prevenir con los métodos que se describen en el presente documento se pueden caracterizar como general como incluyendo cualquier trastorno en el que una célula afectada presenta aumento de la expresión de RAGE o de uno o más ligandos de RAGE, o cualquier trastorno que se pueda tratar (es decir, uno o más síntomas se pueden eliminar o mejorar) mediante una disminución de la función de RAGE. Por ejemplo, la función de RAGE se puede reducir mediante la administración de un agente que altera la interacción

25 entre RAGE y un ligando de RAGE.

[0061] El aumento de la expresión de RAGE se asocia con varios estados patológicos, tales como vasculopatía diabética, nefropatía, retinopatía, neuropatía, y otros trastornos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer y reacciones inmunes/inflamatorias de las paredes de los vasos sanguíneos. Los ligandos de RAGE se producen en tejido

30 afectado con muchos trastornos inflamatorios, incluyendo artritis (tal como artritis reumatoide). Las deposiciones de amiloide en los tejidos causan una diversidad de efectos tóxicos en las células y son característicos de enfermedades denominadas amiloidosis. RAGE se une a material fibrilar de lámina beta, tal como el que se encuentran en el péptido amiloide-beta, Abeta, amilina, amiloide A en suelo y péptidos derivados de priones. RAGE también se expresa a niveles elevados en tejidos que tienen estructuras de amiloide. Por consiguiente, RAGE está

35 implicado en trastornos de amiloide. Se cree que la interacción de RAGE-amiloide da como resultado el estrés oxidativo que conduce a degeneración neuronal.

[0062] Una diversidad de ligandos de RAGE, y en particular los de las familias de S100/calgranulina y Anfoterina (HMGB) se producen en tejidos inflamados. Esta observación es cierta tanto para inflamación aguda, tal como la

40 observada como respuesta a una estimulación con lipopolisacáridos (como en la sepsis) como para inflamación crónica, tal como la que se observa en diversas formas de artritis, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, etc. También se cree que algunas enfermedades cardiovasculares, y en particular las que se derivan de placas ateroscleróticas, tienen un componente inflamatorio importante. Tales enfermedades incluyen enfermedad es

45 oclusivas, trombóticas y embólicas, tales como angina de pecho, trastornos de lacas frágiles y apoplejía embólica, respectivamente. Las células tumorales también evidencian un aumento de la expresión de un ligando de RAGE, en particular anfoterina, lo que indica que algunos cánceres también son un trastorno relacionado con RAGE. Además, los efectos oxidativos y otros aspectos de la inflamación crónica pueden tener un efecto de contribución a la génesis de ciertos tumores.

50 **[0063]** Los AGE son una diana terapéutica para artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias.

[0064] Por consiguiente, los trastornos relacionados con RAGE que se pueden tratar con una composición de la invención como se define en las reivindicaciones incluyen, además de los trastornos autoinmunes que se han

55 analizado anteriormente: amiloidosis (tales como enfermedad de Alzheimer), enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias agudas (tales como sepsis), shock (por ejemplo, shock séptico, shock hemorrágico), enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis, apoplejía, trastorno de placas frágiles, angina de pecho y reestenosis), diabetes (y en particular enfermedades cardiovasculares en diabéticos), complicaciones de diabetes, trastornos relacionados con priones, cánceres, vasculitis y otros síndromes de vasculitis tales como vasculitis necrotizantes, nefropatías, retinopatías y neuropatías.

60

Ejemplos

[0065] En los siguientes ejemplos, se realizaron experimentos en ratones con una proteína de fusión que comprende dominios extracelulares de RAGE de ratón (restos de aminoácidos 1-342) fusionados con los dominios bisagra, CH2

65 y CH3 de la región FC de cadena pesada de IgG2a de ratón. La construcción se expresó en células CHO usando el

sistema de expresión GPEX™. La secuencia de la secuencia RAGE de ratón usada se proporciona en la siguiente tabla.

Tabla 9 (SEC ID N°: 11) Secuencia de RAGE de ratón

MPAGTAARAW VLVLALWGA V AGGQNTARI GEPLVLSCKG APKKPPQOLE WKLNTGRTEA
WKVLS PQGGP WDSVARILPN GSLLL PATGI VDEGTFRCRA TNRRGKEVKS NYRVRVYQIP
GKPEIVDPAS ELTASVPNKV GTCVSEGSYP AGTLSWHLDG KLLIPDGKET LVKEETRRHP
ETGLFTRLRSE LTVIPTQGGT HPTFSCSFSL GLP RRRPLNT APIQLRVREP GPPEGIQLLV
EPEGGIVAPG GTVTLTCAIS AQPPPQVHWI KDGAPLPLAP SPVLLLPEVG HEDEGTYSVCV
ATHPSHG PQE SPPVSIRVTE TGDEGPAEGS VGESGLGTLA LAEPRGPTIK PCPPCKCPAP
NLLGGPSVFI FPPKIKDVL M ISLSPIVTCV VVDVSEDDPD VQISWVNNV EVHTAQTQTH
REDYNSTLRV VSALPIQH QD WMSGKEFKCK VNNKDL PAPI ERTISKPKGS VRAPOVYVLP
PPEEEMTKKQ VTLTCMVTDF MPEDIYVEWT NNGKTELNYK NTEPVLDS DG SYFMYSKLRV
EKKNWVERNS YSCSVVHEGL HNHHTTKSFS RTPGK

5

en la que péptido señal de RAGE = subrayado sencillo, dominio extracelular de RAGE = sin subrayar, Región bisagra de IgG2a de ratón = subrayado doble, Región CH2 de IgG2a de ratón = subrayado discontinuo, y Región CH3 de IgG2a de ratón = subrayado ondulado.

10 EJEMPLO 1

[0066] Efecto de proteínas de fusión de RAGE de la invención en diabetes inducida con estreptozotocina en ratones.

[0067] La diabetes inducida con estreptozotocina en ratones es un modelo reconocido en la técnica para cambios en la retina inducidos por diabetes (véase Obrosova IG, Drel VR, Kumagai AK, Szabo C, Pacher P, Stevens MJ. Early diabetes-induced biochemical changes in the retina: comparison of rat and mouse models. Diabetologia. 2006 Oct; 49 (10): 2525-33).

[0068] El presente experimento implicaba 5 grupos de tratamiento que contenían 15 ratones C57BL/6 por grupo: 1) control no diabético; 2) control diabético que contiene ratones tratados con estreptozotocina a 45 mg/kg en 5 días consecutivos antes de comenzar el estudio para inducir diabetes; 3) los ratones tratados con estreptozotocina también recibieron 10 µg/día de mRAGE-IgG2aFc inyectado IP, 3 inyecciones/semana; 4) los ratones tratados con estreptozotocina también recibieron 100 µg/día de mRAGE-IgG2aFc inyectado IP, 3 inyecciones/semana; y 5) los ratones tratados con estreptozotocina también recibieron 300 µg/día de mRAGE-IgG2aFc inyectado IP, 3 inyecciones/semana.

[0069] Durante el estudio, los ratones se evaluaron para peso corporal, glucosa en sangre, glicohemoglobina (GHb), albuminuria, y sensibilidad táctil como medida de función nerviosa sensorial. Los ratones se sacrificaron al final del estudio se evaluaron para permeabilidad vascular retiniana usando una sonda fluorescente, adherencia de leucocitos a capilares de la retina, y expresión de proteína regulada por NF-κB (COX-2, ICAM, iNOS).

Resultados del estudio de dos meses de duración

[0070] Se estudiaron los efectos de proteína de fusión de RAGE-Ig en el desarrollo de alteraciones inducidas por diabetes en la fisiología y metabolismo de la retina en ratones C57B1/6J. La proteína de fusión se administró por vía intraperitoneal a 3 concentraciones diferentes (10 µg, 100 µg y 300 µg) tres veces a la semana. No se reservaron efectos adversos de ninguna dosis del fármaco en el aumento del peso corporal o salud general de los ratones diabéticos. Los niveles de glucosa en sangre sin ayunas fueron 155 ± 24 mg/dl (media ± DT), 358 ± 38, 417 ± 36, 376 ± 36, y 370 ± 55 en los grupos de proteína de fusión de Control no diabético, Control diabético, Diabético + 10 µg de proteína de fusión de RAGE-Ig, Diabético + 100 µg de proteína de fusión de RAGE-Ig, y Diabético + 300 µg de proteína de fusión de RAGE-Ig, respectivamente.

[0071] Los parámetros relacionados con la retinopatía medidos en estudios a corto plazo fueron (1) leucostasis, (2) permeabilidad de albúmina endógena de vasos retinianos, (3) nitración de proteínas retinianas, y (4) expresión de ICAM y COX-2 de la retina.

1. Leucostasis.

[0072] Métodos: A los 2 meses de diabetes, se extrajo sangre de la vasculatura de animales anestesiados mediante perfusión completa con PBS a través de un catéter en el corazón. A continuación, los animales se perfundieron con lectina de Concanavalina A acoplada a fluoresceína (20 µg/ml en PBS; Vector Laboratories, Burlingame, CA) como

se ha descrito anteriormente (véase Joussen *et al.*, FASEB J. 2004 Sep; 18(12): 1450-2). Se hicieron imágenes de retinas montadas en plano mediante microscopía de fluorescencia, y se hizo recuento del número de leucocitos adherentes a la pared vascular.

- 5 **[0073]** Resultados: Se demostró un efecto significativo de leucostasis en ratones que habían sido diabéticos durante 2 meses en comparación con los no diabéticos ($P < 0,05$). La leucostasis no se inhibía en ninguno de los grupos tratados con la proteína de fusión de RAGE-Ig (véase la Figura 1).

2. Permeabilidad vascular

10

[0074] Métodos: A los 2 meses de diabetes, se hizo criosección de los ojos (10 μm), se fijó en metanol durante 10 min, y se lavó 4x en PBS. Cada sección se incubó en albúmina de suero de oveja anti-ratón (Abcam, Cambridge MA; AB8940; dilución a 1:2000) durante 2 h. Después de lavado, las secciones se incubaron en anticuerpo secundario etiquetado con FTIC (AB 6743; dilución a 1:1000) durante 90 min. Con microscopía de fluorescencia, se

15 determinó la cantidad media de fluorescencia en 3 sitios diferentes para cada una de las 4 capas de retina (capa plexiforme interna, capa nuclear interna, capa externa plexiforme, capa nuclear externa). La cantidad de fluorescencia en cada sitio era el promedio de 10 medidas aleatorias, y la cantidad de fluorescencia en cada capa de retina era el promedio de fluorescencia en cada uno de los 3 sitios diferentes dentro de esa capa.

20 Resultados:

[0075] La diabetes dio como resultado un aumento significativo de la fluorescencia en la retina no vascular (es decir, debido a filtración de albúmina fuera de los vasos) en cada una de las 4 capas de retina estudiadas. Los resultados se muestran en la Figura 2 (2A capa plexiforme interna, 2B capa nuclear interna, 2C capa plexiforme

25 externa, 2D capa nuclear externa). Para evaluar la albúmina en las capas nucleares internas y externas, los inventores midieron de forma intencionada el espacio estrecho entre los núcleos, de modo que estos números podrían ser no tan importantes como los de las capas plexiformes, en las que no había núcleos para alterar las medidas de los inventores.

30 3. Nitración de proteínas de retinianas

[0076] Métodos: A los 2 meses de diabetes, las retinas se aislaron y se homogeneizaron. Se realizaron transferencias puntuales, transfiriendo 50 μg de homogenado de proteína de cada animal a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche (5%), se lavaron, y se inmunotizaron usando anti-

35 nitrotirosina (Upstate Biotechnology, Inc. N.º 5-233; dilución a 1:500) durante 2 horas, a continuación se tiñeron con anticuerpo secundario (conjugado de IgG-HRP de cabra anti-ratón de Bio-Rad; dilución a 1:1000) durante 1 hora. Después de un extenso lavado, la inmunotinción detectada por el anticuerpo se visualizó mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). La quimioluminiscencia dependiente de inmunotinción se registró en película, y la densidad de los puntos inmunoteñidos se cuantificó. Los

40 resultados se expresan como un porcentaje de los valores detectados en los controles no diabéticos.

Resultados:

[0077] Los resultados se muestran en la Figura 3. Los homogenados de retina de ratones diabéticos mostraban el

45 aumento esperado en la nitración de proteínas. La terapia inhibía esta modificación después de la traducción de una manera dependiente de la dosis. Se considera que la nitración de proteínas es un parámetro de estrés tanto oxidativo como nitrosativo.

4. Expresión de ICAM y COX-2 en la retina

50

[0078] Métodos: Las retinas se aislaron y se sometieron a sonicación, y el sobrenadante se usó como extracto de retiniana completo. Las muestras (50 μg) se fraccionaron mediante SDS-PAGE, se sometieron a electrotransferencia para membrana nitrocelulosa, y las membranas se bloquearon en solución salina tamponada con Tris que contiene Tween 20 al 0,02% y leche sin grasa al 5%. Se aplicaron anticuerpos para ICAM-1 (dilución a 1:200; Santa Cruz

55 Biotechnology) y COX-2, seguido de anticuerpo secundario durante 1 hora. Después de lavado, los resultados se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada.

Resultados:

[0079] Los resultados se muestran en la Figura 4. Dado que la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales desempeña un papel fundamental en la adhesión de glóbulos blancos a la pared del vaso (leucostasis), los inventores midieron el efecto de la diabetes y la terapia sobre la expresión de ICAM-1 en la retina. Dos meses de diabetes dieron como resultado un aumento significativo en la expresión de ICAM-1 en la retina. La administración de la proteína de fusión RAGE-Ig dio como resultado una disminución dependiente de la dosis en la expresión de la

65 ICAM, y la dosis más alta inhibía de forma significativa esta expresión.

[0080] La expresión de una banda inmunoteñida coherente con el peso molecular de COX-2 no aumentaba en la diabetes y no cambiaba en animales seguían la terapia (no se muestra).

[0081] El uso de criterios de valoración en este estudio a corto plazo de los efectos de la proteína de fusión RAGE-Ig se seleccionaron porque se había encontrado que todos estaban asociados con el desarrollo de las primeras etapas (degenerativas) de retinopatía diabética, es decir, diversas terapias que se ha encontrado que inhiben la degeneración inducida por diabetes de los capilares retiniana también han inhibido estos defectos.

[0082] La inhibición de RAGE no inhibía anomalías relacionadas con la permeabilidad vascular ni con el estrés nitrosativo en la retina. El estrés nitrosativo también se contempla como un marcador de estrés oxidativo. El inhibidor de RAGE, sin embargo, no inhibía anomalías relacionadas con la leucostasis.

EJEMPLO 2

[0083] Efecto de proteínas de fusión de RAGE de la invención en diabetes inducida con estreptozotocina a largo plazo en ratones.

[0084] La diabetes inducida con estreptozotocina en ratones es un modelo reconocido en la técnica para cambios en la retina inducidos por diabetes (véase Obrosova IG, Drel VR, Kumagai AK, Szabo C, Pacher P, Stevens MJ. Early diabetes-induced biochemical changes in the retina: comparison of rat and mouse models. Diabetologia. 2006 Oct; 49 (10): 2525-33.)

[0085] Los estudios a largo plazo implicaban 5 grupos de tratamiento que contenían 25 ratones C57BL/6 por grupo: 1) control no diabético; 2) control diabético que contiene ratones tratados con estreptozotocina a 45 mg/kg en 5 consecutivos antes de comenzar el estudio para inducir diabetes; 3) los ratones tratados con estreptozotocina también recibieron 10 µg/día de mRAGE-IgG2aFc inyectado IP, 3 inyecciones/semana; 4) los ratones tratados con estreptozotocina también recibieron 100 µg/día de mRAGE-IgG2aFc inyectado IP, 3 inyecciones/semana; y 5) los ratones tratados con estreptozotocina también recibieron 300 µg/día de mRAGE-IgG2aFc inyectado IP, 3 inyecciones/semana.

[0086] Durante el estudio, los ratones se evaluaron para peso corporal, glucosa en sangre, glicohemoglobina (GHb), albuminuria, y sensibilidad táctil como medida de función nerviosa sensorial. Los ratones se sacrificaron al final del estudio y se evaluaron para histopatología cuantitativa y neurodegeneración en la retina.

[0087] Los parámetros relacionados con la retinopatía metidos en el estudio largo plazo fueron (1) capilares acelulares, (2) fantasmas pericíticos, y (3) células ganglionares. Como un marcador de neuropatía periférica, en el estudio a largo plazo también se midió la sensibilidad de la pata a un toque ligero.

Histopatología retiniana inducida por diabetes

[0088] Después de 10 meses de diabetes, los ojos se fijaron en formalina, y se aisló una retina de cada animal, se lavó en agua corriente durante una noche, y se digirió durante 2 horas en una solución de tripsina en bruto como han informado los inventores anteriormente. La vasculatura de la retina se aisló mediante desalojo suave de células neuronales con un "pincel" hecho de un solo pelo. Cuando está totalmente limpia de células neuronales, la vasculatura aislada se colocó sobre un portaobjetos de vidrio, se secó durante una noche, se tiñó con hematoxilina y ácido peryódico de Schiff, se deshidrató y se colocó el cubreobjetos. Los capilares degenerados (acelulares) se cuantificaron en 6-7 áreas de campo que corresponden a la parte media de la retina (200X aumentos) de una manera oculta. Los capilares acelulares se identificaron como tubos de vasos de tamaño capilar sin núcleos en ninguna parte a lo largo de su longitud, y se informaron por milímetro cuadrado de área de la retina. Los fantasmas de pericíticos se calcularon a partir de la prevalencia de "protuberancias" que sobresalen en las membranas basales capilares a partir de las que los pericitos habían desaparecido. Al menos 1.000 células capilares (células endoteliales y pericitos) en 5 áreas de campo en la mitad de retina (400 aumentos) se examinaron de una manera enmascarada. Se excluyeron los fantasmas en cualquier vaso ya acelular.

[0089] Para estudiar los efectos de la diabetes en la neurodegeneración de la retina, se hizo recuento de células en la capa de células ganglionares. Los ojos fijados en formalina se incluyeron en parafina, se seccionaron de forma sagital a través de la retina, pasando a través del nervio óptico, y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se hizo recuento del número de células en la capa de células ganglionares en dos áreas (parte media de la retina y retina posterior adyacente al nervio óptico) en ambos lados del nervio óptico. Se hizo un promedio de las áreas comparables de ambos lados del nervio óptico y se expresaron por unidad de longitud.

[0090] Resultados. Como base de espera en el trabajo previo, la diabetes a largo plazo dio como resultado en un aumento significativo en el número de capilares acelulares, degenerados en la retina (Figura 5A). Todas las dosis de la proteína de fusión RAGE-Ig inhibían de forma significativa esta degeneración capilar, sin tener ningún efecto sobre la gravedad de la hiperglucemia. La diabetes también tendía a aumentar la degeneración de pericitos (fantasmas

pericíticos), pero los resultados no conseguían significancia estadística (Figura 5B). Los inventores han encontrado previamente que la pérdida de pericitos es mucho más difícil de detectar en ratones C57B1/6 diabéticos en comparación con las ratas diabéticas o especies más grandes, y los inventores ahora lo consideran como un parámetro no fiable de enfermedad vascular en este modelo. Tal vez es una consecuencia de la falta de detección de pérdida significativa de pericitos en los diabéticos de control, que no detectaba ningún efecto de la proteína de fusión de RAGE-Ig en la pérdida de pericitos en estos ratones.

[0091] La diabetes no inducía una disminución en el número de células en la capa de células ganglionares de la retina (es decir, neurodegeneración) en estos ratones C57B1/6. Este hallazgo era coherente con un estudio previo de este modelo de ratón. En ausencia de un efecto de diabetes en la neurodegeneración de la retina, los inventores no son capaces de evaluar si el inhibidor habría tenido un efecto en la neurodegeneración.

Sensibilidad al tacto ligero (un marcador de neuropatía periférica).

[0092] Los pacientes con neuropatía diabética pueden presentar una diversidad de sensaciones anómalas que incluyen dolor espontáneo, dolor evocado por tacto ligero e hiperalgesia. Hay datos acumulativos con respecto a que roedores diabéticos reproducen esta hiperalgesia, y desarrollan una alodinia táctil. En roedores, esto se mide como el umbral de respuesta táctil de la pata.

[0093] Métodos: Los ratones (8 meses de diabetes) se transfirieron a una jaula de ensayo con un fondo de malla de alambre y se les permitió que se aclimataron de 10 a 15 min. Se usaron filamentos de von Frey para determinar el 50 % de umbral de retirada mecánica para la retirada de la pata. Una serie de filamentos con aumento logarítmico de la rigidez, comenzando con uno que tenía un peso de pandeo de 0,6 g, se aplicaron en secuencia a la superficie plantar de la pata trasera derecha con una presión que hacía que el filamento pandeara. La elevación de la pata se registró como una respuesta positiva y se eligió un filamento más ligero para la siguiente medida. Si no había respuesta después de 5 segundos, se usaba el siguiente filamento más pesado a partir de ese momento. Se continuó con este método hasta que se habían realizado cuatro medidas después de que se habían producido un cambio inicial en el comportamiento o hasta cinco respuestas negativas consecutivas (6 g) o cuatro respuestas negativas consecutivas (0,4 g). La secuencia resultante de las puntuaciones positivas y negativas se usó para calcular un 50 % de umbral de respuesta de retirada.

[0094] Resultados: La diabetes aumentaba de forma significativa la sensibilidad de la pata al tacto ligero, lo que significa que se requiere una cantidad menor de presión para los animales diabéticos para que retiren su pata que era que necesitan los animales no diabéticos (Figura 6). Este defecto inducido por diabetes se inhibía de forma significativa en cada dosis de la proteína de fusión sRAGE-Ig.

[0095] Retinopatía: Los estudios realizados usando la proteína de fusión RAGE-Ig para se realizaron para dos periodos de diabetes: (1) estudios a largo plazo (10 meses) para evaluar el efecto de la terapia en la histopatología a largo plazo de la retinopatía diabética que se desarrolla en ratones, y (2) estudios de 2-3 meses para evaluar los efectos fisiológicos y moleculares de la terapia que supuestamente subyacen a los efectos con respecto a la histopatología de largo plazo. Los puntos finales fisiológicos y moleculares estudiados con respecto a los efectos de la proteína de fusión RAGE-Ig se seleccionaron porque todos se han encontrado en otros estudios para su asociación con (y probablemente relacionados de forma causal con) el desarrollo de las primeras etapas (degenerativas) de retinopatía diabética. Las tres dosis de la terapia inhibidas clara y significativamente la degeneración inducida por diabetes de la vasculatura retiniana. De forma análoga, parecía que las tres dosis del fármaco inhibían también el aumento inducido por diabetes de la permeabilidad de la retina en estos ratones. Estos resultados son de gran importancia clínica, porque las primeras etapas (no proliferativas) de retinopatía diabética todavía se definen basándose en la patología vascular (no perfusión y degeneración vascular, y aumento de la permeabilidad).

[0096] El efecto de la terapia en los puntos finales moleculares y fisiológicas medidos en retinas de ratones diabéticos era mixto. La inhibición de RAGE inhibía anomalías relacionadas con el estrés nitrosativo, un marcador de estrés oxidativo en la retina. El inhibidor de RAGE, sin embargo, no inhibía anomalías relacionadas con la leucostasis. La falta de efecto de la terapia en leucostasis es sorprendente porque otro grupo informó recientemente que su sRAGE inhibía el aumento de la leucostasis en diabetes. La evidencia que los inventores han generado desde el inicio de sus estudios usando la proteína de fusión Ig-RAGE (Diabetes 57: 1387-93, 2008), sin embargo, indica que los efectos de una terapia con fármacos para leucostasis retiniana en diabetes no predice el efecto de la terapia en la degeneración de capilares retinianos en diabetes. Por lo tanto, la falta de la terapia en la leucostasis retiniana no disminuye en modo alguno la ineficacia de los efectos observados del fármaco.

[0097] De forma sorprendente, parecía ser un efecto de la dosis del fármaco con respecto a la expresión de ICAM-1 y nitración de proteínas en retinas de los animales diabéticos, mientras que este efecto de la dosis no era evidente en la permeabilidad y degeneración de capilares retinianos. Parecería que esto sugiere que ni ICAM ni la nitración están implicados en los defectos vasculares de la retina en diabetes, aunque los inventores tienen datos del uso de animales con supresión genética de ICAM-1 que argumenta en contra de esta conclusión.

[0098] Es evidente que el fármaco llegó a la retina, ejerció efectos biológicos, y demostró una capacidad significativa del fármaco para inhibir al menos las lesiones vasculares iniciales de retinopatía diabética.

[0099] Neuropatía sensorial: Otros han postulado que algunos productos finales de glicación avanzada (AGE) y la interacción de estos AGE con RAGE inducen estrés oxidativo, regulan de forma positiva NF-κB y diversos genes proinflamatorios mediados por NF-κB en los nervios, y disfunción neurológica exagerada, incluyendo sensación de dolor alterada. Los presentes datos son coherentes con la evidencia de que la señalización mediada por RAGE contribuye al desarrollo de al menos algunos aspectos de la neuropatía diabética, y proporciona evidencia de que la proteína de fusión sRAGE-Ig inhibe este proceso en estudios a largo plazo.

EJEMPLO 3

[0100] Evaluación de una proteína de fusión RAGE-Ig usando el Modelo de Ratón de Artritis Inducida con Colágeno de Tipo II.

[0101] La inmunización de cepas susceptibles de ratones con colágeno de tipo II, el componente principal del cartílago de la articulación, induce una artritis progresiva, inflamatoria (Wooley *et al.*, Journal of Experimental Medicine 1981; 154: 688-700). La artritis inducida por colágeno (CIA) se caracteriza clínicamente por eritema y edema, con aumentos de ancho de la pata habitualmente de un 100 %. Un índice de puntuación clínica se ha desarrollado para evaluar la progresión de la enfermedad a distorsión de articulaciones y espondilitis (Wooley, Methods In Enzymology 1988; 162: 361-373). La histopatología de las articulaciones afectadas revela sinovitis, formación de pannus, y erosión de cartílago y hueso, que también se puede representar con un índice. Algunos hallazgos de laboratorio inmunológicos incluyen niveles elevados de anticuerpos con respecto a colágeno de tipo II, e hipergammaglobulinemia. Este modelo ahora está bien establecido para ensayo de enfoques inmunoterapéuticos con respecto a enfermedades de articulaciones (Staines *et al.*, British Journal of Rheumatology 1994; 33 (9): 798-807), (y se ha empleado de forma satisfactoria para el estudio de agentes tanto biológicos como farmacológicos para el tratamiento de artritis reumatoide (RA) (Wooley *et al.*, Arthritis Rheum 1993; 36: 1305-1314, y Wooley *et al.*, Journal of Immunology 1993; 151: 6602-6607).

[0102] El antagonismo del receptor de RAGE se reconoce como una posible diana terapéutica en RA. El bloqueo de RAGE en ratones con artritis inducida con colágeno dio como resultado la supresión de la evidencia clínica e histológica de artritis, y la mejora de la enfermedad se asoció con una reducción en los niveles de TNFα, IL-6, y metaloproteinasas de matriz MMP-3, MMP-9 y MMP-13 en tejido de pata artrítica (Hofmann *et al.*, Genes Immun 2002; 3 (3): 123-135). Esto indica que la artritis inducida por colágeno es sensible a terapia dirigida por RAGE.

[0103] Este experimento evaluará la influencia de la proteína de fusión RAGE-Ig en CIA en tres dosis administradas desde el momento de la inmunización con colágeno de tipo II. El diseño del estudio se muestra en la Figura 7.

[0104] Cuarenta ratones DBA/1 LacJ de 8-10 semanas de edad se obtuvieron en Jackson Labs, y se aclimataron en la instalación durante un mínimo de 10 días antes de la experimentación. Todos los animales pesaban > 16 gramos al inicio del experimento. Los ratones se dividieron en uno de cuatro grupos de tratamiento: 1) 100 µl de PBS estéril mediante inyección diaria por i.p.; 2) 100 µl de proteína de fusión RAGE-Ig que contiene PBS estéril a 10 µg de inyección diaria por i.p.; 3) 100 µl de proteína de fusión RAGE-Ig que contiene PBS estéril a 100 µg de inyección diaria por i.p.; y 4) 100 µl de proteína de fusión RAGE-Ig que contiene PBS estéril a 300 µg de inyección diaria por i.p.

[0105] Tres días después de la dosis inicial, a todos que se les inyectaron 100 µg de colágeno bovino de tipo II en adyuvante completo de Freund (FCA) por vía intradérmica en la base de la cola. Los ratones se controlaron con examen diario para el inicio de la enfermedad, que se registró. Los ratones se pesaron semanalmente, y se el estado de salud general. Los animales afectados con artritis se evaluaron clínicamente cinco veces a la semana hasta diez semanas después de la inmunización, y las medidas de la pata se hicieron tres veces a la semana. Los ratones sin signos de artritis diez semanas después de la inmunización se consideraron negativos para la enfermedad.

RESULTADOS

[0106] Salud y Toxicidad General. No se produjeron episodios tóxicos agudos durante el ensayo, y todos los animales sobrevivieron a la duración del experimento. El tratamiento se toleró bien y no se observaron signos adversos, tales como talangiectasia o irritación en la piel. Los pesos de los ratones (Figura 8) indican cambios menores en el peso en el transcurso del ensayo, lo cual es habitual debido a la pérdida de peso transitoria en los animales individuales que corresponde a la aparición de la enfermedad. Ninguna de estas variaciones entre los grupos alcanzó significancia estadística.

[0107] Incidencia e Inicio de Artritis. La incidencia terminal de artritis de colágeno en el ensayo se muestra en la Figura 9. Los ratones de control alcanzaron un inicio de un 100 %, que no es inusual en el modelo clásico de artritis de colágeno, en el que la incidencia habitual varía de un 80 %-100 %. Los ratones tratados con 10 µg al día de

RAGE alcanzaban una incidencia de un 80 %, que no era una reducción de incidencia significativa. Los ratones tratados con 100 µg al día de RAGE presentaban una incidencia de artritis de un 60 %, que era significativamente más baja que la del grupo de control ($p < 0,05$). De forma sorprendente, la incidencia de la artritis en ratones tratados con 300 µg de RAGE era de un 100 %, y por lo tanto similar a la incidencia del control.

5

[0108] La media (y ETM) del día de inicio de la enfermedad se muestra en la Figura 10. El inicio de la enfermedad era habitual en el grupo control, con un día de media con la primera aparición de artritis de 38,6. El inicio de la enfermedad en ratones tratados ya sea con 10 µg o 100 µg de RAGE se retrasaba de forma nominal a 42,5, lo que no alcanzaba significación estadística. Sin embargo, el inicio de la enfermedad se retrasaba de forma significativa ($p < 0,05$) en los ratones tratados con RAGE 300 µg. Por lo tanto, aunque los ratones a la dosis alta no presentaban una reducción de la incidencia de enfermedad, el tiempo para el desarrollo de artritis clínicamente evidente aumentaba de forma notable.

[0109] La modulación del inicio de la enfermedad mediante tratamiento con RAGE se puede evaluar fácilmente mediante la representación de incidencia de enfermedad con el tiempo (Figura 11). El inicio de la enfermedad de rápido habitual característico de CIA se observa en el grupo de control, mientras que los ratones tratados con RAGE en cualquiera de 10 µg o 100 µg daba como resultado en un retraso del inicio de la enfermedad y una incidencia terminal de artritis más baja. Durante aproximadamente ocho semanas, los ratones tratados con 300 µg de RAGE desarrollarán la enfermedad con un patrón similar, pero una serie de animales con artritis final daba lugar a una alta incidencia de enfermedad elevada, pero un retraso del inicio de la enfermedad.

[0110] Gravedad y Progresión de la Enfermedad. El análisis de la puntuación de articulaciones acumulativa en animales tratados y de control revelaba efectos significativos de terapia con RAGE en la severidad de la artritis inducida con colágeno (Figura 12). Los ratones de control desarrollaban la enfermedad progresiva crónica habitual, con un aumento notable en el índice acumulativo de artritis. Por el contrario, los ratones tratados con RAGE en cualquier dosis mostraban una disminución notable en la puntuación de artritis. La diferencia entre los grupos de control y tratados consiguió un nivel elevado de significación estadística ($p < 0,001$) desde el Día 43 después de la inmunización, y esta diferencia se mantuvo durante todo el ensayo. Aunque la terapia con RAGE de 100 µg/día conseguía una puntuación acumulada de artritis más baja, no había diferencias significativas entre los grupos de RAGE con respecto a la puntuación de artritis, lo que sugiere que se consiguió un efecto de "umbral", en lugar de un efecto clásico dependiente de la dosis.

[0111] El análisis de la influencia de la terapia con RAGE en el número de patas artríticas (Figura 13) no muestra un efecto significativo sobre la progresión de la enfermedad. Una vez más, se observó una influencia significativa en el número de patas implicadas desde el Día 43 en adelante. El nivel de significación variaba de $p < 0,001$ a $p < 0,025$, lo que puede reflejar que la influencia de RAGE era más pronunciada en la gravedad de la enfermedad que la progresión de la artritis; sin embargo, el número máximo de patas implicadas (40) es más limitado que la puntuación de enfermedad acumulativa máxima (120). Una vez más, no se producían variaciones significativas entre los grupos tratados con RAGE, aunque el grupo de 100 µg de RAGE presentaba el nivel más elevado de retardo de artritis.

40

[0112] Los resultados sugieren que la administración de la proteína RAGE ejercía un efecto notable sobre la artritis inducida con colágeno cuando se administra usando un protocolo profiláctico. No se observaron efectos tóxicos evidentes de inyección de RAGE en cualquier dosis y parecía que el tratamiento se toleraba muy bien. La incidencia general de la enfermedad se redujo de forma significativa en los ratones que recibieron 100 µg al día, y se observó un retraso de inicio de la enfermedad en ratones tratados con 300 µg/día. Sin embargo, la indicación más evidente de la actividad clínica se observó en la reducción de la puntuación de la enfermedad y el recuento de pata artrítica, en el que se detectaba una amplia separación entre los ratones tratados con RAGE y los animales de control a partir del Día 43 después de la inmunización. En este punto, los animales de control experimentaron la progresión habitual de la artritis severa, mientras que el tratamiento con RAGE en todas las dosis retrasaba la progresión de la enfermedad.

50

[0113] Evaluación histopatológica: Las extremidades de todos los ratones se retiraron a la finalización del estudio de evaluación clínica, y se almacenaron en solución de formalina tamponada neutra. Las articulaciones se descalcificaron durante 18 días en ácido fórmico al 10 %, se deshidrataron, y se embebieron en bloques de parafina. Se cortaron secciones a lo largo de un eje longitudinal, se montaron y se tiñeron con cualquiera de hematoxilina y eosina o Azul de Toluidina. Las muestras de ensayo se cortaron hasta aproximadamente la línea media, y a continuación las muestras centrales sagitales se montaron para su evaluación. Esto permitió una evaluación geográfica coherente. Se montaron de cinco a diez muestras (normalmente 4 - 6 muestras por portaobjetos). Después de la tinción, los portaobjetos se unieron permanentemente con cubreobjetos. Se evaluaron un mínimo de 3 secciones separadas por muestra de ensayo con ocultación, con el evaluador no siendo consciente de la asignación de grupo. En las extremidades delanteras, se puntuó todo, codo, muñeca y articulaciones metacarpianas, mientras que en las patas traseras se puntuó todo, rodillas, tobillos y articulaciones de los metatarsianos. Los dedos no se evaluaron, ya que el procedimiento de seccionamiento elimina la mayoría de las articulaciones de PIP. Los portaobjetos se evaluaron para presencia de sinovitis, formación de pannus, erosiones marginales, cambios en la arquitectura (en su mayoría subluxación), y destrucción. A continuación se asignó a cada sección una puntuación

65

total, basándose en estos puntos colectivos. El sistema de puntuación se basaba en lo que sigue a continuación:

[0114] La sinovitis se juzgó por el espesor de la membrana sinovial, y se contuvo como si a continuación: 0 para menos de 3 células de espesor; 1 para 3 a 5 células de espesor; 2 para 6 - 10 células de espesor; 3 para 10 a 20 células de espesor; y 4 para 20 - 30 células de espesor.

[0115] La formación de pannus se puntuó como sigue a continuación: 0 para ninguna formación de pannus; 1 para microvellosidades presentes; 2 para unión de pannus evidente; 3 para unión de pannus notable; y 4 para espacio de las articulaciones ocupado por pannus.

10

[0116] Las erosiones marginales se calificaron como sigue a continuación: 0 para ninguna erosión visible; 1 para indentaciones menores en la zona de unión capsular; 2 para erosiones de cartílago evidentes; 3 para erosiones extendidas en el hueso subcondral; y 4 para erosión de hueso y cartílago mayor.

15 **[0117]** Los cambios de arquitectura se calificaron como sigue a continuación: 0 para arquitectura normal de las articulaciones; 1 para cambios edematosos; 2 para subluxación menor de superficies de articulaciones; 3 para subluxación mayor de superficies de articulaciones; 4 para fibrosis completa y formación de puentes de colágeno.

20 **[0118]** La puntuación total refleja: 0 para aspecto normal clásico de las articulaciones; 1 para cambios menores; coherente con remisión; pueden ser clínicamente normales; 2 para artritis inflamatoria definida; 3 enfermedad erosiva, inflamatoria mayor; y 4 para artritis erosiva, destructiva.

25 **[0119]** Degradación de Cartílago y Matriz Ósea. Se tiñeron secciones en serie para componentes de la matriz del cartílago usando la tinción histoquímica con Azul de Toluidina. Se evaluaron las secciones de azul de toluidina para pérdida de proteoglicanos. La tinción en la superficie articular se comparó con la tinción en la placa de crecimiento, y se puntuó como sigue a continuación: 0 para Ninguna pérdida de proteoglicanos; tinción con Azul de Toluidina Normal; 1 para Pérdida menor de proteoglicanos; Tinción débil de cartílago superficial; 2 para Pérdida moderada de proteoglicano; Tinción débil de cartílago superficial; 3 para Pérdida significativa de proteoglicano; Sin tinción con Azul de Toluidina de cartílago superficial; y 4 para Pérdida mayor de proteoglicanos; Sin tinción con Azul de
30 Toluidina de cartílago profundo.

RESULTADOS

35 **[0120]** Hallazgos Histológicos de artritis inducida por Colágeno. Las secciones se evaluaron para los parámetros inflamatorios y erosivos de la enfermedad. El aspecto de la artritis (Figura 14) revela patología de enfermedad erosiva inflamatoria habitual para este punto de tiempo en el grupo de control (tratado con PBS), con las características artríticas habituales de hipertrofia sinovial e hiperplasia, con unión notable de pannus y erosiones marginales.

40 **[0121]** El tratamiento con la proteína de fusión RAGE-Ig a 10 µg/ml (Figura 14B) daba como resultado cambios moderados en los parámetros inflamatorios y erosivos, con una mejora general en el aspecto de erosiones y superficies del cartílago interrumpidas. El tratamiento con la proteína de fusión de RAGE-Ig a 100 µg/ml (Figura 14C) dada como resultado en una reducción en la formación de pannus y erosiones en comparación con el control, y la diferencia global era bastante notable. Sin embargo, la administración de la proteína de fusión RAGE-Ig a 300 µg/ml
45 (Figura 14D) daba lugar a artritis que parecía en cierto modo menos grave que la patología observada en el control de solución salina, pero sin embargo era bastante grave, con hipertrofia sinovial e hiperplasia, con unión notable de pannus y erosiones marginales.

50 **[0122]** El análisis de las puntuaciones inflamatorias (Figura 15) revelaba una reducción de la inflamación en ratones tratados con la proteína de fusión RAGE-Ig en todas las dosis en comparación con los animales de control (tratados con solución salina). Sin embargo, la sinovitis se redujo de forma significativa ($p < 0,05$) solamente en el grupo de 100 µg/ml, y la formación de pannus presentaba reducciones de puntuación similares ($p < 0,03$). Las reducciones en los parámetros de la enfermedad inflamatoria observadas usando la proteína de fusión RAGE-Ig en cualquiera de 10 µg/ml o 300 µg/ml no alcanzaron significancia estadística.

55

[0123] La evaluación de cambios en las características erosivas (erosiones y cambios en la arquitectura de las articulaciones) de artritis inducida con colágeno presentada un patrón de efectos similar. Se observó una reducción significativa ($p < 0,01$) en erosiones de las articulaciones entre el grupo tratado con la proteína de fusión RAGE-Ig a 100 µg/ml en comparación con los animales de control (tratados con solución salina) (Figura 16), mientras que las reducciones observadas en ratones tratados con la proteína de fusión RAGE-Ig a 10 µg/ml y 300 µg/ml no alcanzaban significancia.

60 **[0124]** La combinación de los parámetros histopatológicos en una puntuación total de artritis histológica (Figura 17) reflejaba los resultados de los parámetros de la patología individual. No se observaron diferencias significativas entre
65 los animales tratados con control (solución salina) y los ratones tratados con la proteína de fusión RAGE-Ig a

100 µg/ml ($p < 0,02$), y la puntuación total en los ratones tratados con 10 µg/ml apenas alcanzaba significancia estadística ($p = 0,05$), mientras que no se observaban reducciones significativas en las puntuaciones totales de la enfermedad usando la proteína de fusión RAGE-Ig a 300 µg/ml.

5 **[0125]** Las secciones teñidas con Azul de Toluidina se examinaron para determinar si la proteína de fusión RAGE-Ig incluía en la pérdida de proteínas de la matriz de la articulación artrítica. Los datos (que se muestran en las Figuras 18 y 19) sugieren que la proteína de fusión RAGE-Ig protegía frente a la pérdida de proteoglicanos, pero este efecto solamente era estadísticamente significativa ($p < 0,05$) a la dosis de 100 µg/ml. El grupo de control de PBS presenta una pérdida importante de matriz del cartílago (proteoglicanos y colágenos), y se observa una pérdida notable de tinción en la superficie del cartílago proximal en los ratones tratados con la proteína de fusión RAGE-Ig a 300 µg/ml. Por el contrario, hay una buena conservación de la proteína de la matriz con la administración de la proteína de fusión RAGE-Ig a 10 µg/ml o 100 µg/ml.

15 **[0126]** Los hallazgos histológicos confirman los datos clínicos que indican que el tratamiento de la artritis inducida por colágeno con la proteína de fusión RAGE-Ig daba como resultado un efecto sobre la incidencia y la gravedad de la enfermedad. Los parámetros histológicos alcanzaron altos niveles de significación estadística en los ratones tratados con 100 µg/ml, y alcanzaron significación estadística en la patología general en ratones tratados con 10 µg/ml. La proteína de fusión RAGE-Ig a 100 µg/ml conseguía una buena conservación de la estructura de la articulación, y una reducción significativa de todos los parámetros de artritis bajo evaluación. La impresión general es que la proteína de fusión RAGE-Ig bloqueaba la fase erosiva de la artritis, ya que el grado de cambios inflamatorios estaba menos influenciado que los parámetros de la enfermedad secundaria. Los ratones tratados con la proteína de fusión RAGE-Ig a 300 µg/ml no estaban protegidos en el mismo grado como las dosis más bajas, lo que de nuevo aumenta la posibilidad de una respuesta de supresión a este nivel de administración de proteínas. En general, estos resultados están de acuerdo con las observaciones clínicas realizadas en el estudio, y demuestran que la proteína de fusión RAGE-Ig puede ejercer un efecto antiartrítico.

Listado de secuencias

[0127]

30 <110> Galactica pharmaceuticals
 <120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE RAGE
 35 <130> 14895-00001-WO
 <150> 60/943.994
 <151> 14-06-2007
 40 <160> 11
 <170> PatentIn versión 3.4
 <210> 1
 45 <211> 2016
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctgtgtec tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtagggtgctc aaaacatcac agccccgatt ggcgagccac tgggtgctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagcc 180
 tgggaaggctc tgtctcccca gggaggaggc cctgggaca gtgtggctcg tgtcctccc 240
 aacggctccc tcttcctccc ggctgtcggg atccaggatg aggggatrrt ccgggtccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tetgaactca cggctgggtgt tcccaataag 420
 gtggggacat gtgtgtcaga gggaaactac cctgcaggga ctcttagctg gcactcggat 480
 gggaaagccc tgggtgccga tgagaagggg gtatctgtga aggaacagac caggagacac 540
 cctgagacag ggtctctcac actgcagtcg gagctaatgg tgacccagc ccggggagga 600
 gatcccctgc ccacctctc ctgtagctrc agcccaggcc ttcctcgaca ccgggccttg 660
 cgcacagccc ccattccagc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggaggga ggtccaattg 720
 gtggtggagc cagaaggagg agcagtagct cctggtggaa ccgtaacctt gactgtgaa 780
 gtccctgccc agcccctccc tcaaatccac tggatgaagg atggtgtgcc ctgcccctt 840
 cccccagcc ctgtgtgat cctccctgag atagggcctc aggaccaggg aacctacagc 900
 tgtgtggcca cccattccag ccacgggccc caggaaagcc gtgctgtcag catcagcacc 960
 atcgaaccag gcgagggagg gccaaactga ggcctctgtg gaggatcagg gctgggaact 1020
 ctagccctgg ccgcttccc caagggccca tccgtcttc ccctggcgc ctgctccagg 1080
 agcacctcg agagcaagc cgcctgggc tgcctgtca aggactactt ccccgaaaccg 1140
 gtgacggtgt cgtggaacte aggcgcctg accagcggcg tgcacacctt cccgctgtc 1200
 ctacagtcc caggactcta ctccctcagc agcgtgtgga ccgtgccc cagcagctt 1260
 ggcacgaaga cctacacct caactgtgat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1320
 agagttyagt ccaaatatgg tccccatgc ccatcatgcc cagcacctga gttcctggg 1380
 ggaccatcag tcttctgtt cccccaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccggacc 1440

 cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg agccagggaag accccgaggt ccagttcaac 1500
 tggtagctgg atggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagttc 1560
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc 1620
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa ggcctcccgt ctccatcga gaaaaccatc 1680
 tccaagcca aagggcagcc ccgagagcca cagggtgaca cctgcccct atcccaggag 1740
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgtca aaggcttcta cccagcagc 1800
 atcgcctgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac caagcctccc 1860
 gtgctggact ccgacggctc ctcttctctc tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg 1920
 tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgtctc gtgatgcatg aggetctgca caaccactac 1980
 acacagaaga gccctcccct gtctctcggg aaatga 2016

<210> 2
 <211> 671
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 564 634 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln

ES 2 564 634 T3

				165					170					175	
Thr	Arg	Arg	His	Pro	Glu	Thr	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu
			180					185					190		
Met	Val	Thr	Pro	Ala	Arg	Gly	Gly	Asp	Pro	Arg	Pro	Thr	Phe	Ser	Cys
		195				200						205			
Ser	Phe	Ser	Pro	Gly	Leu	Pro	Arg	His	Arg	Ala	Leu	Arg	Thr	Ala	Pro
	210					215					220				
Ile	Gln	Pro	Arg	Val	Trp	Glu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Gln	Leu
225					230					235					240
Val	Val	Glu	Pro	Glu	Gly	Gly	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr
				245					250					255	
Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Pro	Ala	Gln	Pro	Ser	Pro	Gln	Ile	His	Trp	Met
			260					265					270		
Lys	Asp	Gly	Val	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Val	Leu	Ile	Leu
		275					280					285			
Pro	Glu	Ile	Gly	Pro	Gln	Asp	Gln	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Thr
	290					295					300				
His	Ser	Ser	His	Gly	Pro	Gln	Glu	Ser	Arg	Ala	Val	Ser	Ile	Ser	Ile
305					310					315					320
Ile	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Gly	Pro	Thr	Ala	Gly	Ser	Val	Gly	Gly	Ser
			325						330				335		
Gly	Leu	Gly	Thr	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			340					345					350		
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
		355					360					365			
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	370					375					380				
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
385					390					395					400
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				405					410					415	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
			420					425					430		
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro
		435					440					445			

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 450 455 460
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 465 470 475
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 485 490 495
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 500 505 510
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 515 520 525
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 530 535 540
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 545 550 555 560
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 565 570 575
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 580 585 590
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 595 600 605
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 610 615 620
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 625 630 635 640
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 645 650 655
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 660 665 670

<210> 3
 <211> 2037
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtcctgtg gggggcagta 60
 gtagggtgtc aaaaatcac agcccggatt ggcgagccac tgggtgctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccaccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagcc 180

10

tggaaagtcc tgtctccccā gggaggāggc ccttgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttcttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccgggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctgggtgt tcccaataag 420
 gtggggācat gtgtgtcaga gggāagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat 480
 gggāagcccc tggtyccgāā tgāgaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac 540
 cctgagacag ggctcttccā āctgcagtcg gāgctaattg tgaccccagc ccggggaggā 600
 gatccccgtc ccaccttctc ctgttagctt agcccāggcc tccccgaca ccgggccttg 660
 cgcacagccc ccattccagc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggaggā ggtccaattg 720
 gtggggaggc cagaaggtgg agcagttagt cctgggtggā ccgtaaccct gacctgtgāā 780
 gtccctgccc agccctctcc tcaaatccac tggatgaagg atggtgtgcc cttgcccctt 840
 cccccagcc ctgtgtgat cctccctgag atagggcttc aggaaccagg aacttacagc 900
 tgtgtggcca cccattccag ccacgggccc caggāāagcc gtgtgtcag cātcagcātc 960
 atcgaaccag gcgaggaggg gccāactgca ggctctgtgg gaggatcagg gctgggaact 1020
 ctagccctgg ccggtagcgg ctccggaagt ggggcttcca ccaagggccc atctgtcttc 1080
 cccctggcgc cctgtctccag gagcācttc gagagcacag ccgctctggg ctgectggtc 1140
 aaggactact tccccgāācc ggtgācgggtg tctgtggaact caggcgcctt gaccagcggc 1200
 gtgcacāct tcccggctgt cctacagtc tccaggāctt actcctctcag cagcgtggtg 1260
 accgtgectt ccāgcagctt gggcācgāāg acctacāctt gcaacgtagā tcācāagccc 1320
 agcaacacca aggtggācāā gagagttag tccāaatatg gtecccatg cccatcatgc 1380
 ccāgcāctg agtccctggg gggāccatca gtcttctctt tcccccaāā acccaaggāc 1440
 actctcatga tctcccggāc ccctgaggtc acgtgcgtgg tgggtggāctg gāgccaggāā 1500
 gāccccgāgg tccāgttcaā ctggtaectg gatggcgtgg aggtgcātaā tgccaagācā 1560
 aagccgcggg aggāgcāgtt caācāgcācā taccgtgtgg tcāgcgtctt cāccgtctg 1620
 cāccāggāct ggctgāācgg cāaggāgtāc āagtgcāagg tctccaācāā aggcctcccg 1680
 tctctcatcg āgāāāāccāc ctccaāagcc āāagggcāgc cccgāgāgcc ācāgggtgāc 1740
 āccctgcccc catcccāggā ggāgātyācc āāgāāccāgg tcāgcctgāc ctgcttggtc 1800
 āāaggctctt āccccāgcā catcgcctg gtgtgggāgā gcaatgggca gccggāgāāc 1860
 āactācāgā ccācgcctc egtgctggāc tccgācggct ccttcttctt ctācāgcāgg 1920
 ctāāccgtgg ācāāgācāg gtggcāggāg gggāatgtct tctctatgct cgtgatgcat 1980
 gāggctctgc ācāāccāctā cācācāgāāg āgcctctccc tgtctctcgg gāāatgā 2037

<210> 4
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

ES 2 564 634 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 564 634 T3

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
 275 280 285
 Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
 290 295 300
 His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
 305 310 315 320
 Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
 325 330 335
 Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala
 340 345 350
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 355 360 365
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 370 375 380
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 385 390 395 400
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 405 410 415
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 420 425 430
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 435 440 445
 Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu
 450 455 460
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 465 470 475 480
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 485 490 495
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 500 505 510
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 515 520 525
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 530 535 540

ES 2 564 634 T3

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 545 .550 555 560

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 565 570 575

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 580 585 590

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 595 600 605

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 610 615 620

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 625 630 635 640

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 645 650 655

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 660 665 670

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 675

<210> 5
 <211> 2016
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

```

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggccc tcagtcctgtg gggggcagta      60
gtaggcgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggctgctgaa gtgtaagggg      120
gcccccaaga aaceatecca gggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct      180
tggaaaggtcc tgtctcccca gggaggagge cctggggaca gtgtggctcg tgtcctccc      240
aacggctccc tcttcttcc ggctgtcggg atecaggatg aggggatttt ccggtgccag      300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccraag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt      360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctgggtgt tcccaataag      420
gtggggacat gtgtgtcaga ggaagctac cctgcagga ctcttagctg gcaactggat      480
gggaagcccc tgggtgccga tgagaagggg gtatctgtga aggaacagac caggagacac      540
cctgagacag ggctcttcac actgcagctg gagctaattg tgaccccagc ccggggagga      600
gatccccgtc ccacctctc ctgtagcttc agcccaggcc tccccgacg ccgggccttg      660
cacacagccc ccatccagcc cctgtctcgg gacccctgtc ctctggagga ggtccaattg      720
gtggtggagc cagaaggtgg agcagtagct cctgggtgaa ccgtaacct gacctgtgaa      780
gtccctgccc agccctctc tcaaatccac tggatgaagg atggtgtgcc cttgccccct      840
    
```

10

```

ccccccagcc ctgtgtgat cctccctgag atagggcctc aggaccaggg aacctacagc 900
tgtgtggcca cccattccag ccacgggccc caggaaagcc gtgtgttcag catcagcacc 960
atcgaaccag gcgaggaggg gccaaactgca ggctctgtgg gaggatcagg gctgggaact 1020
ctagccctgg ccgcttccac caaggyecca tccgtcttcc ccttggcgcc ctgtctccagg 1080
agcacctccg agagcacagc cgccttgggc tgcctggtea aggactactt ccccgaaccg 1140
gtgacggtgt cgtggaactc aggegcccctg accageggcg tgcacacctt cctgggtgtc 1200
ctacagtect caggactcra ctctctcagc agcgtgtgtg ccgtgccctc cagcagcttg 1260
ggcacgaaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacacca ggtggacaag 1320
agagttgagt ccaaatatgg tccccatgc ccatcatgce cagcacctga gttcctgggg 1380
ggaccatcag tcttctgtt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat cccccggacc 1440
cctgaggtea cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggaag accccgaggt ccagttcaac 1500
tgytacgtgg atggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagttc 1560
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtctctc accaggactg gctgaacggc 1620
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa ggcctcccgt cctccatcga gaaaaccatc 1680
tccaaagcca aagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgcccc atcccaggag 1740
gagatgacca agaaccaggt tagcttgacc tgcctggtea aaggcttcta ccccagegac 1800
atcgcctggt agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1860
gtgtctggact ccgacggctc ctctctcttc tacagcaggc taaccgttga caagagcagg 1920
tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggcctctga caaccactac 1980
acacagaaga gccctctccc gtctctctggg aaatga 2016

```

<210> 6
 <211> 671
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

```

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

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

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

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

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

```

10

ES 2 564 634 T3

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
 85 90 95
 Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
 100 105 110
 Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
 115 120 125
 Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
 130 135 140
 Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
 145 150 155 160
 Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
 165 170 175
 Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
 180 185 190
 Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
 195 200 205
 Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg Arg Arg Ala Leu His Thr Ala Pro
 210 215 220
 Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240
 Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
 245 250 255
 Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
 260 265 270
 Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
 275 280 285
 Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
 290 295 300
 His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
 305 310 315 320
 Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
 325 330 335
 Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 340 345 350
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

ES 2 564 634 T3

<210> 7
 <211> 2037
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

```

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggccc tcagtctgtg gggggcagta      60
gtagggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggctgtgaa gtgtaagggg      120
gcccccaaga aaccacccca gctggctggaa tggaaactga acacagggcc gacagaagct      180
tggaaaggtcc tgtctccccca gggaggaygc cctgggaca gtgtggctcg tgccttccc      240
aacggctccc tcttcttcc ggctgtggg atccaggatg aggggatitc ccgggtccag      300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagteegtgt ctaccagatt      360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctgggtg tccaataag      420
gtggggacat gtgrytcaga gggaaagctac cctgcagggg ctcttagctg gcacttggat      480
gggaagcccc tgggtgccga tgagaagggg gtatctgtga aggaacagac caggagacac      540
cctgagacag ggtcttccac actgcagtcg gagctaatgg tgaccccagc ccggggagga      600
gateccccgtc ccacctctc ctgtagcttc agcccaggcc tccccgacg ccgggccttg      660
cacacagccc ccatccagcc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg      720
gtggtggagc cagaaggtgg agcagtagct cctggggaa cgtaacctt gacctyrgaa      780
gtccctgccc agcccctctc tcaaatecac tggatgaagg atggtgtgce ctgcccctt      840
ccccccagcc ctgtgtgat cctccctgag atagggctc aggaccaggg aacctacagc      900
tgtgtggcca cccattccag ccacgggccc caggaaagcc gtgctgtcag catcagcacc      960
atcgaaaccg gcgaggaggg gccaaactgca ggctctgtgg gaggatcagg gctgggaact      1020
ctagccctgg ccggtagcgg ctccggaagt ggggcttcca ccaagggccc atccgtcttc      1080
ccctggcgc cctgtctccg gaggacctcc gagagcacag ccgccctggg ctgcttggtc      1140
aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tctggaact caggcgcctt gaccagcggc      1200
gtgcacacct tcccggctgt cctacagtc tcaaggactc actccctcag cagcgtggtg      1260
accgtgccc ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga tcaaacgccc      1320
agcaacacca aggtggataa gagagtryag tccaatatg gtcccccatg cccatcatgc      1380
ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac      1440
actctcatga tctcccggac cctgaggtc acgtgcgtgg tggtagcgt gagccaggaa      1500
gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca      1560
aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg      1620

caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcgaag tctccaacaa aggcctcccg      1680
tcttccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc acagggtgac      1740
accttgcctc catccagga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcttgytc      1800
aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac      1860
aactacaaga ccacgectcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcagg      1920
ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaaatgtc tctcatgctc cgtgargcat      1980
gaggtctctg acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctcgg gaaatga      2037
    
```

ES 2 564 634 T3

<210> 8
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

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

ES 2 564 634 T3

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

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

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

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

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

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
 275 280 285

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

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

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

Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala
 340 345 350

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 355 360 365

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 370 375 380

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 385 390 395 400

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 405 410 415

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 420 425

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 435 440 445

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu
 450 455 460

ES 2 564 634 T3

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 465 470 475 480
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 485 490 495
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 500 505 510
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 515 520 525
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 530 535 540
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 545 550 555 560
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 565 570 575
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 580 585 590
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 595 600 605
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 610 615 620
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 625 630 635 640
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 645 650 655
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 660 665 670
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 675

5 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 9

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10

15 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 10

5

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 11

<211> 575

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Arg Cys Arg Ala Thr Asn Arg Arg Gly Lys Glu Val Lys Ser Asn Tyr
 100 105 110

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Pro Asp Gly Lys Glu Thr Leu Val Lys Glu Glu Thr
 165 170 175

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

Val Ile Pro Thr Gln Gly Gly Thr His Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe
 195 200 205
 Ser Leu Gly Leu Pro Arg Arg Arg Pro Leu Asn Thr Ala Pro Ile Gln
 210 215 220
 Leu Arg Val Arg Glu Pro Gly Pro Pro Glu Gly Ile Gln Leu Leu Val
 225 230 235 240
 Glu Pro Glu Gly Gly Ile Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
 245 250 255
 Cys Ala Ile Ser Ala Gln Pro Pro Pro Gln Val His Trp Ile Lys Asp
 260 265 270
 Gly Ala Pro Leu Pro Leu Ala Pro Ser Pro Val Leu Leu Leu Pro Glu
 275 280 285
 Val Gly His Glu Asp Glu Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Pro
 290 295 300
 Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Pro Pro Val Ser Ile Arg Val Thr Glu
 305 310 315 320
 Thr Gly Asp Glu Gly Pro Ala Glu Gly Ser Val Gly Glu Ser Gly Leu
 325 330 335
 Gly Thr Leu Ala Leu Ala Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
 340 345 350
 Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 355 360 365
 Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser
 370 375 380
 Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
 385 390 395 400
 Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
 405 410 415
 Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
 420 425 430
 Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
 435 440 445
 Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile
 450 455 460

ES 2 564 634 T3

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro
 465 470 475 480
 Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
 485 490 495
 Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
 500 505 510
 Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser
 515 520 525
 Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
 530 535 540
 Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
 545 550 555 560
 His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 565 570 575

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende al menos un polipéptido que comprende:
 - 5 (a) una primera secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 1-301, los aminoácidos 24-301, los aminoácidos 1-344, o los aminoácidos 24-344 de la SEC ID N°: 6, siendo capaz la primera secuencia de aminoácidos de unirse a un ligando de RAGE; y
 - (b) una segunda secuencia de aminoácidos que es un dominio constante de inmunoglobulina IgG4 de cadena pesada humana.
- 10 2. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la primera secuencia de aminoácidos comprende los aminoácidos 1-344 de la SEC ID N°: 6.
3. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 8.
- 15 4. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6.
- 20 5. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión consiste en la SEC ID N°: 6.
6. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende los aminoácidos 24-671 de SEC ID N°: 6.
- 25 7. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente un engarce entre la primera secuencia de aminoácidos y la segunda secuencia de aminoácidos.
8. Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
- 30 9. Una célula hospedadora recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8 y/o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
10. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 5 ó 6.
- 40 12. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 para su uso en el tratamiento de dermatitis, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, uveítis oftálmica, inflamación pulmonar autoinmune, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad ocular inflamatoria autoinmune, lupus sistémico eritematoso, resistencia a la insulina, artritis reumatoide, retinopatía diabética, esclerodermia, nefropatía diabética, neuropatía diabética, enfermedad de Alzheimer, una enfermedad autoinmune, o una enfermedad inflamatoria aguda.
- 45

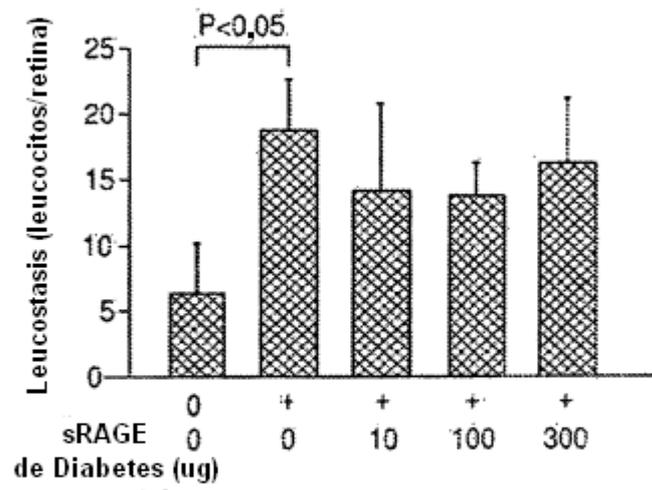


FIG. 1

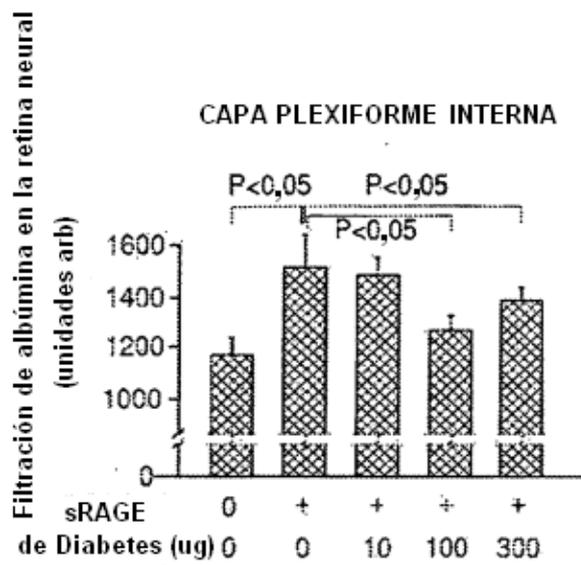


FIG. 2A

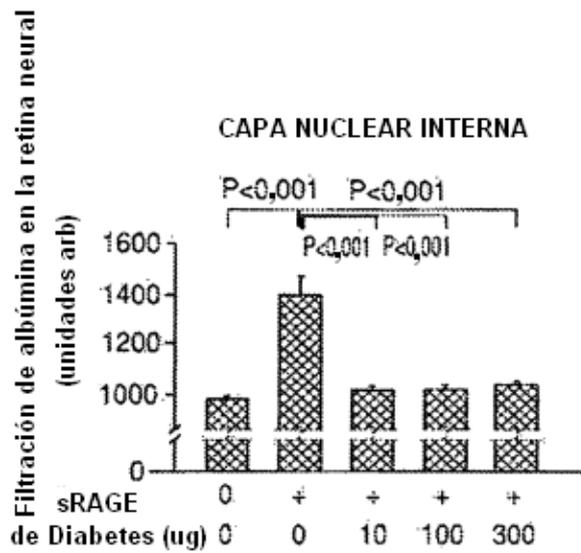


FIG. 2B

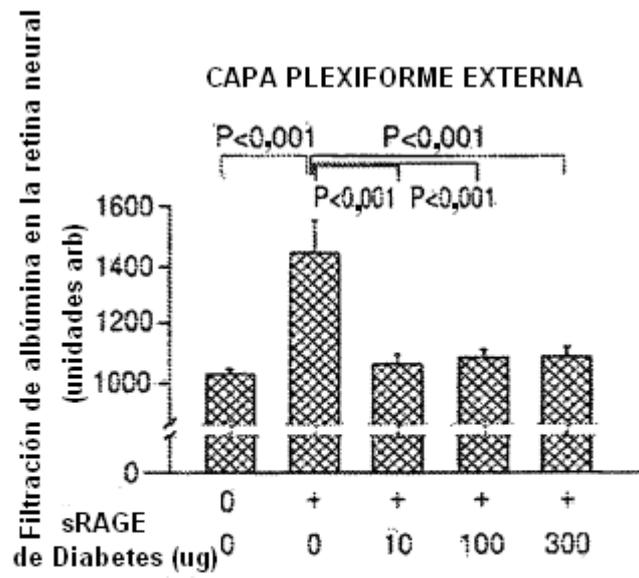


FIG. 2C

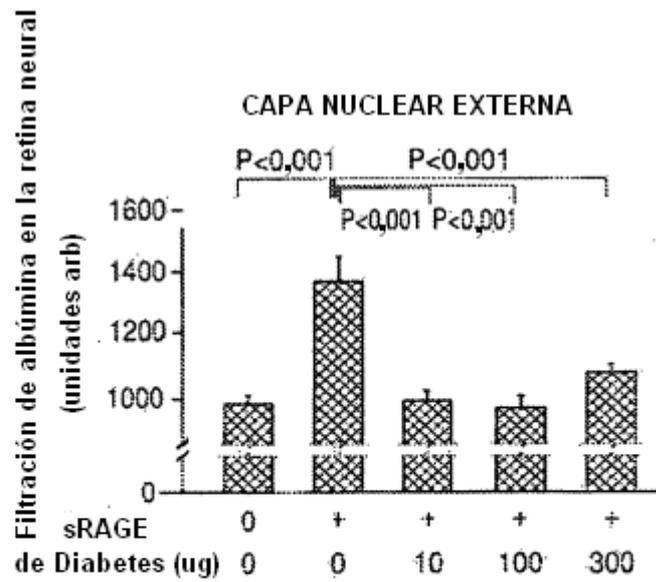


FIG. 2D

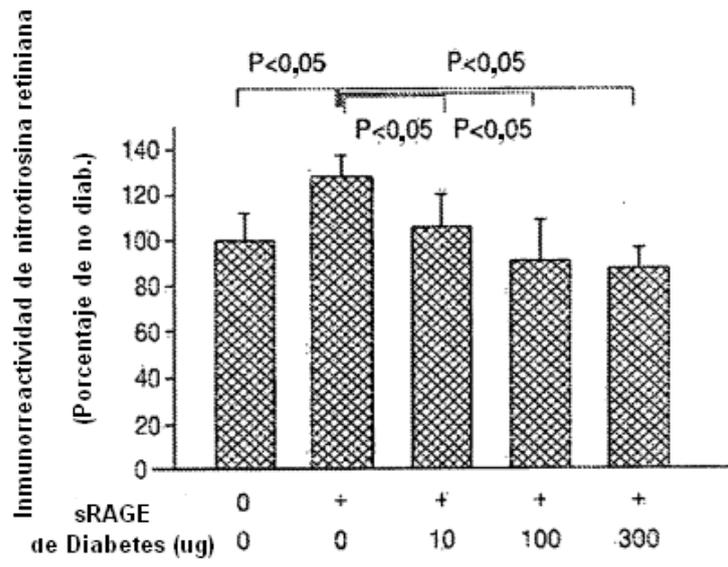


FIG. 3

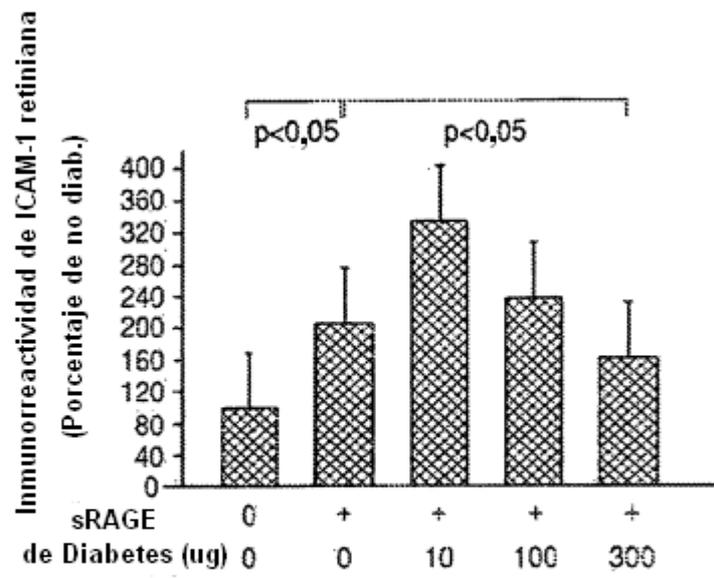


FIG. 4

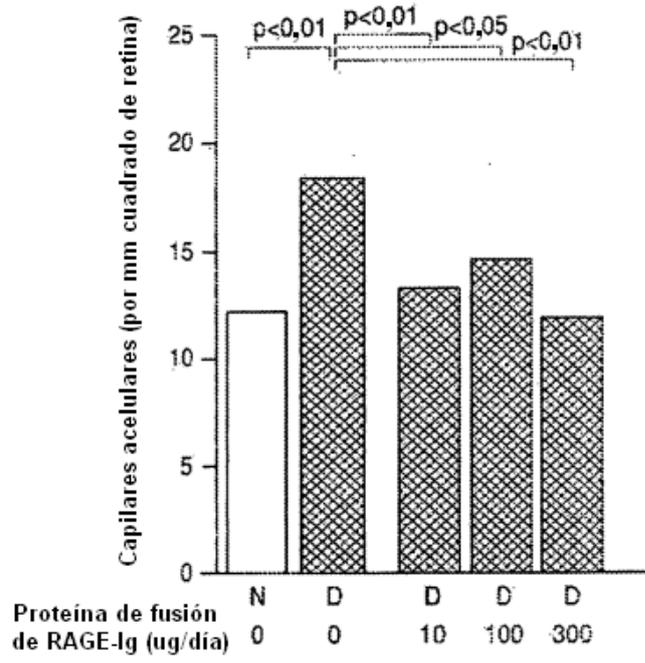


FIG. 5A

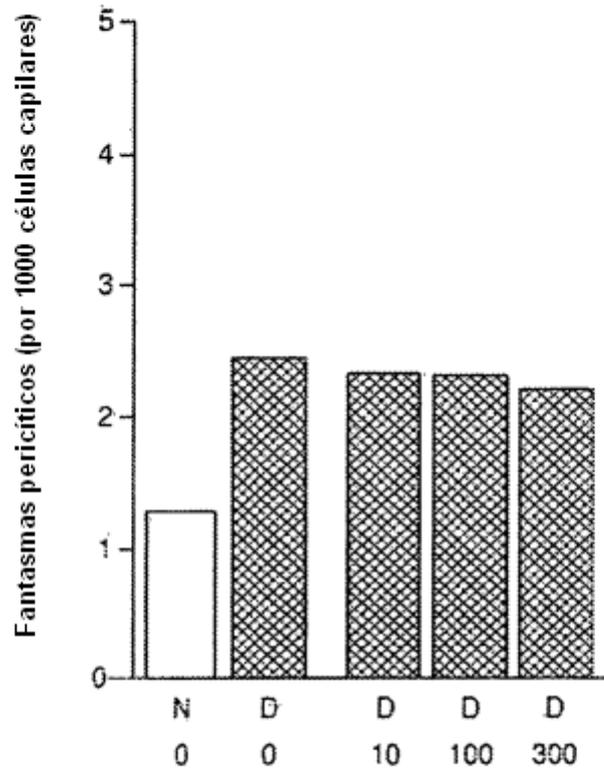


FIG. 5B

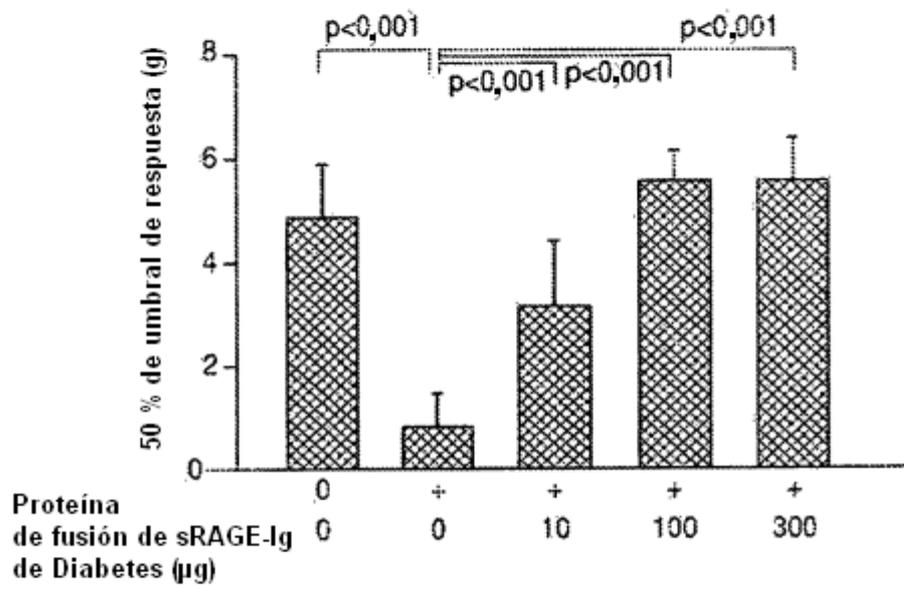


FIG. 6

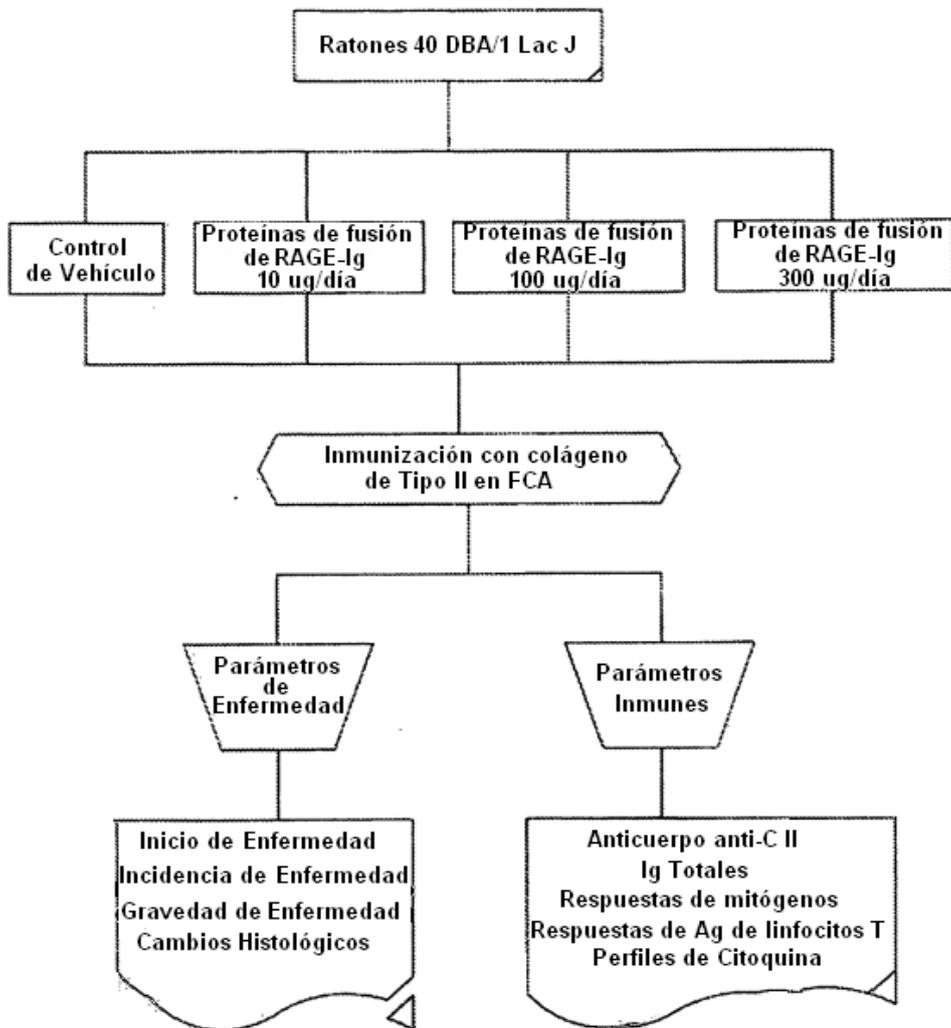


FIG. 7

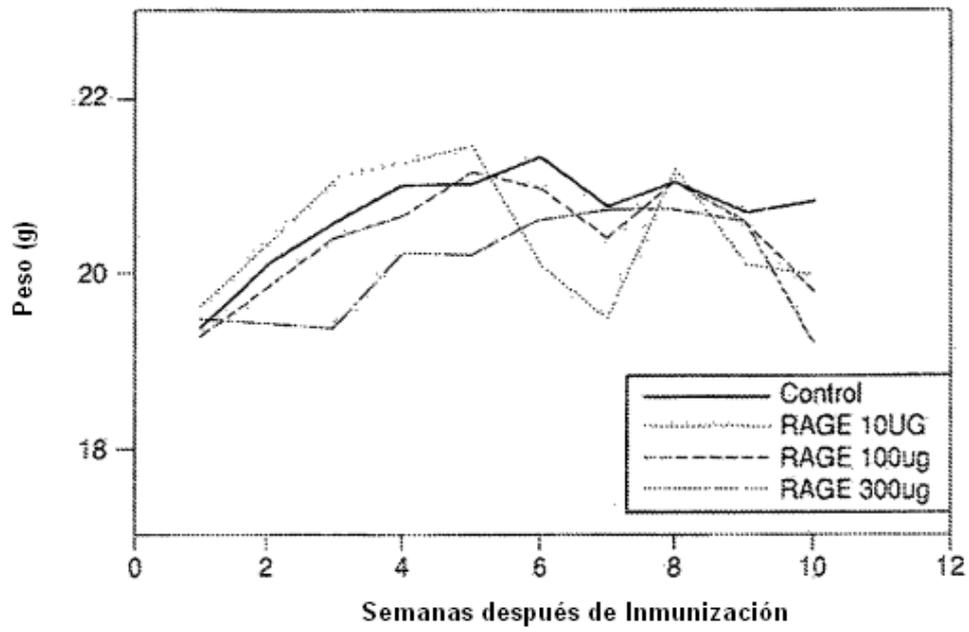


FIG. 8

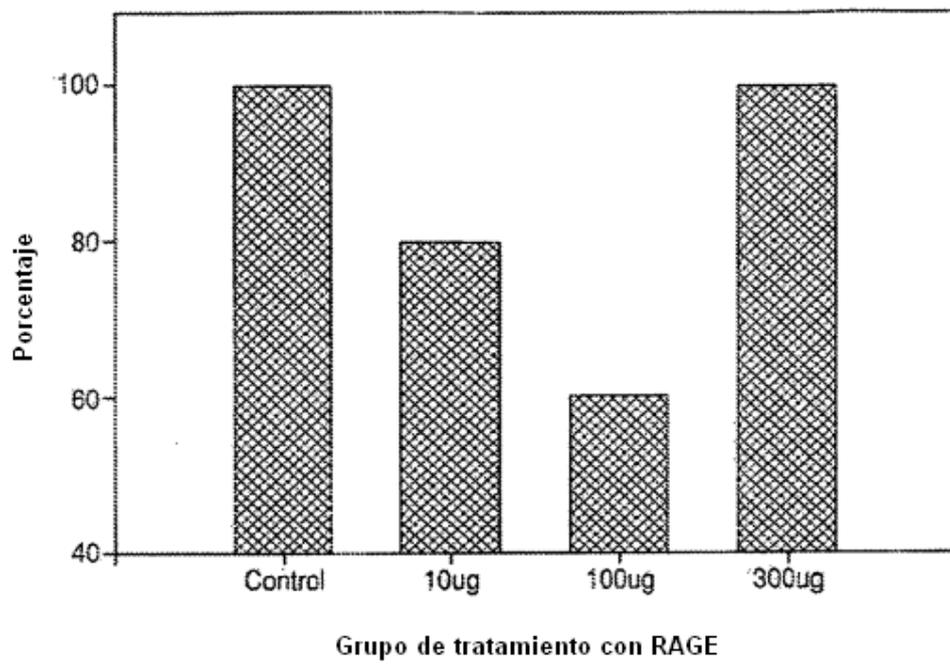


FIG. 9

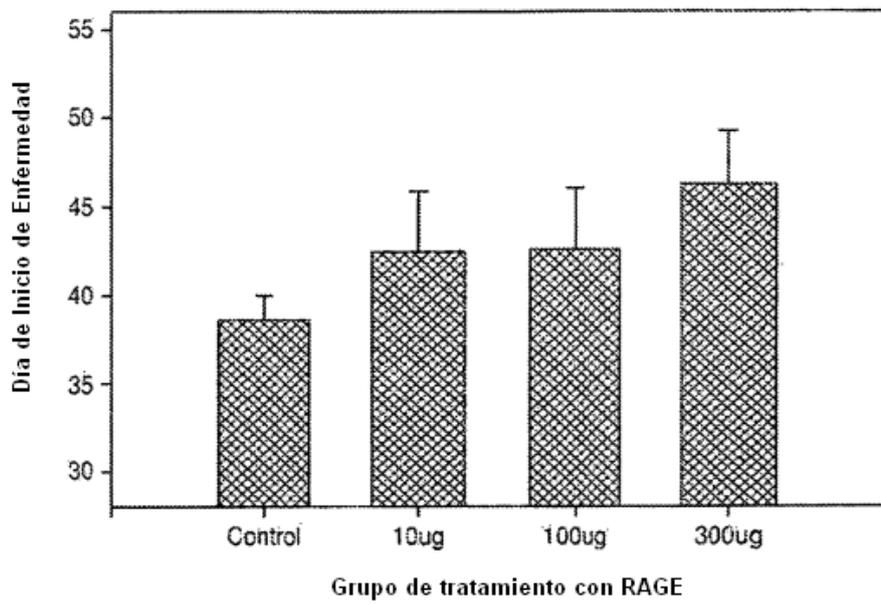


FIG. 10

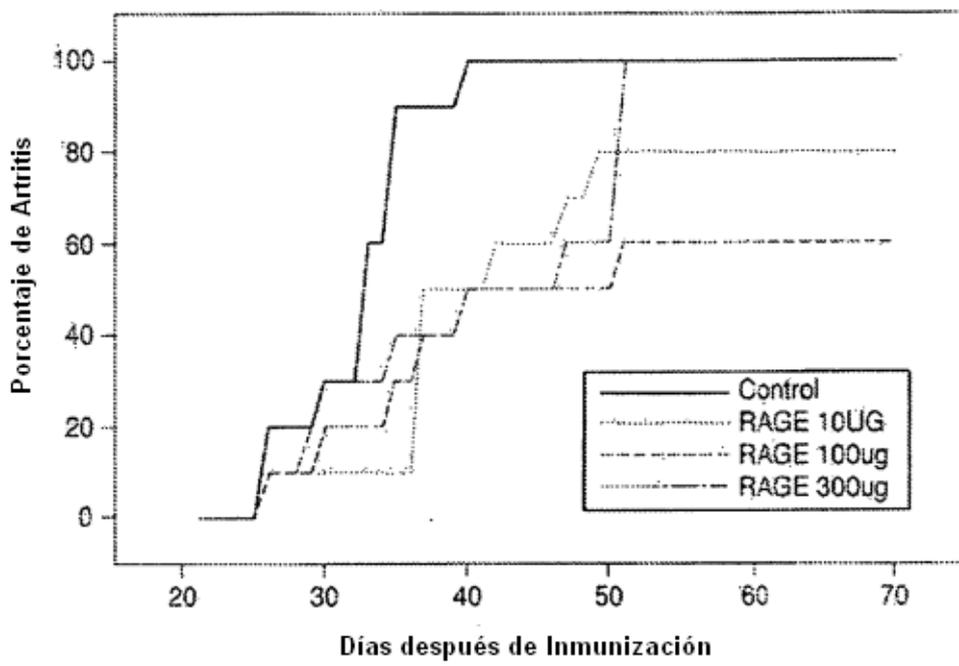


FIG. 11

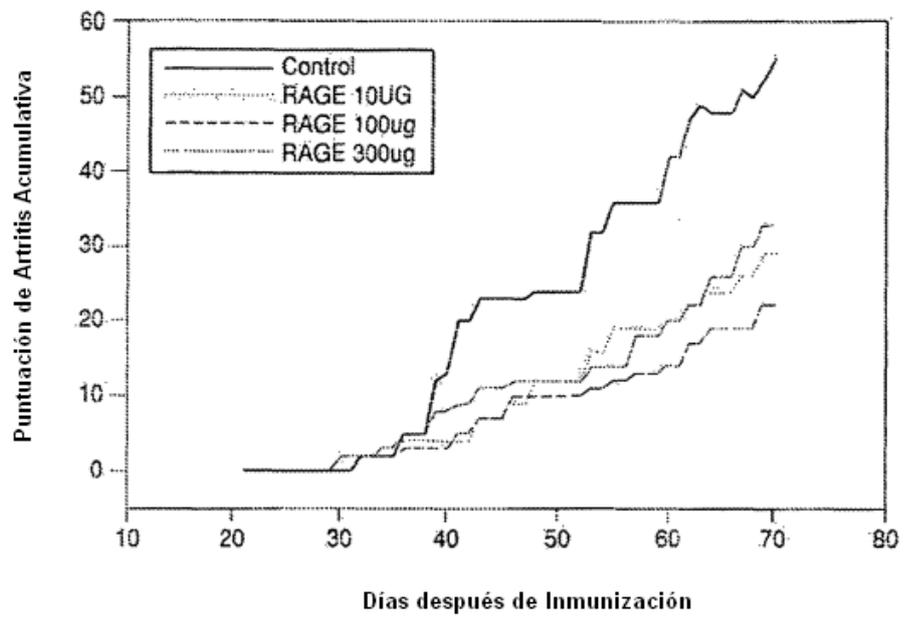


FIG. 12

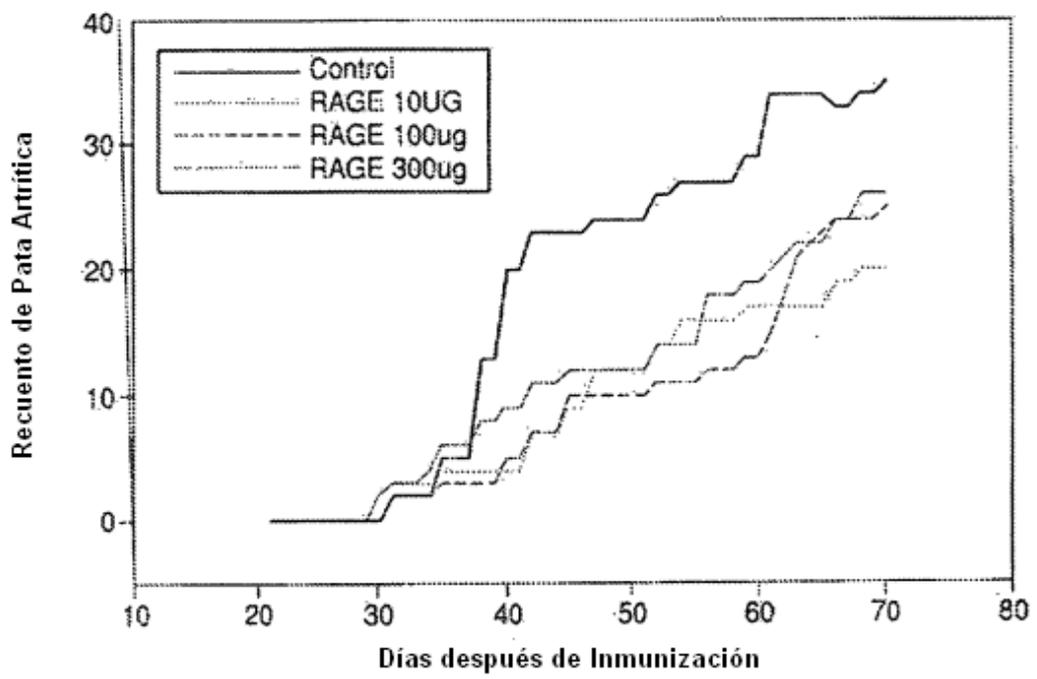


FIG. 13

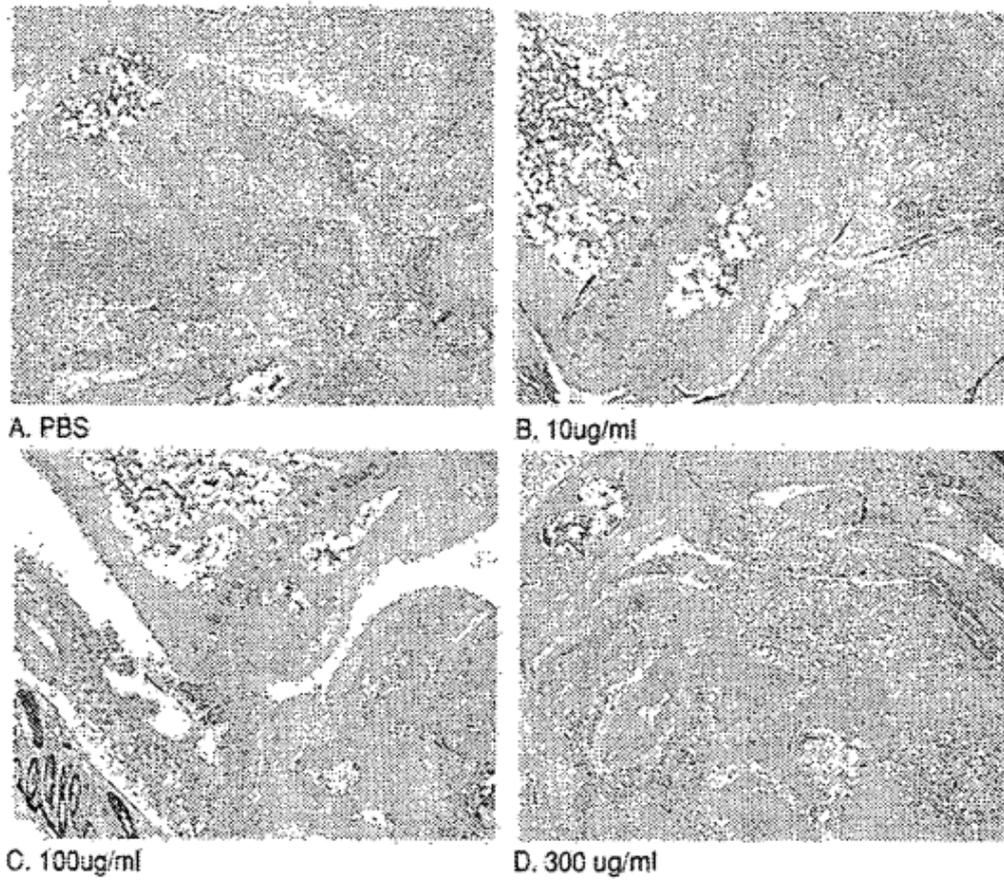


FIG. 14

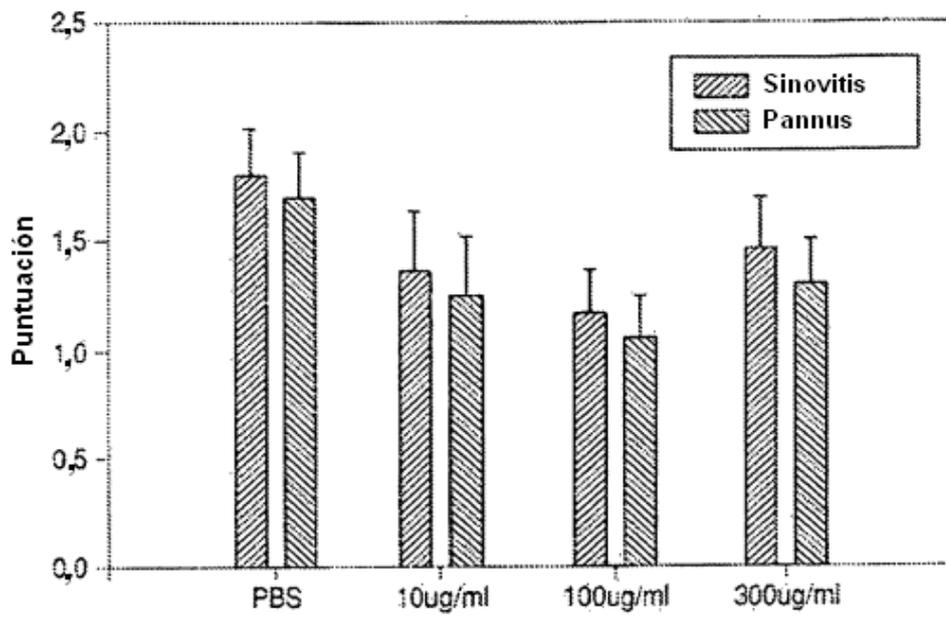


FIG. 15

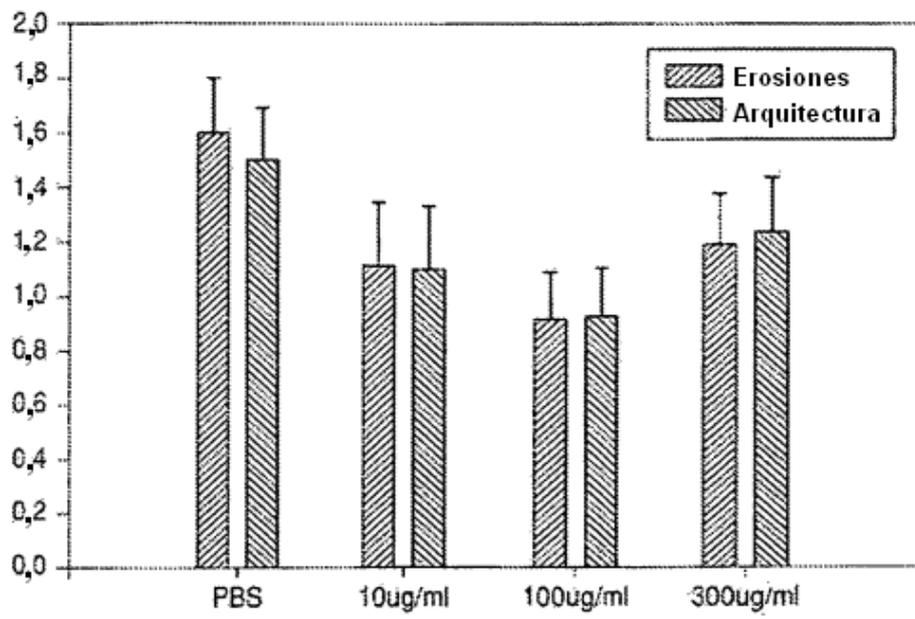


FIG. 16

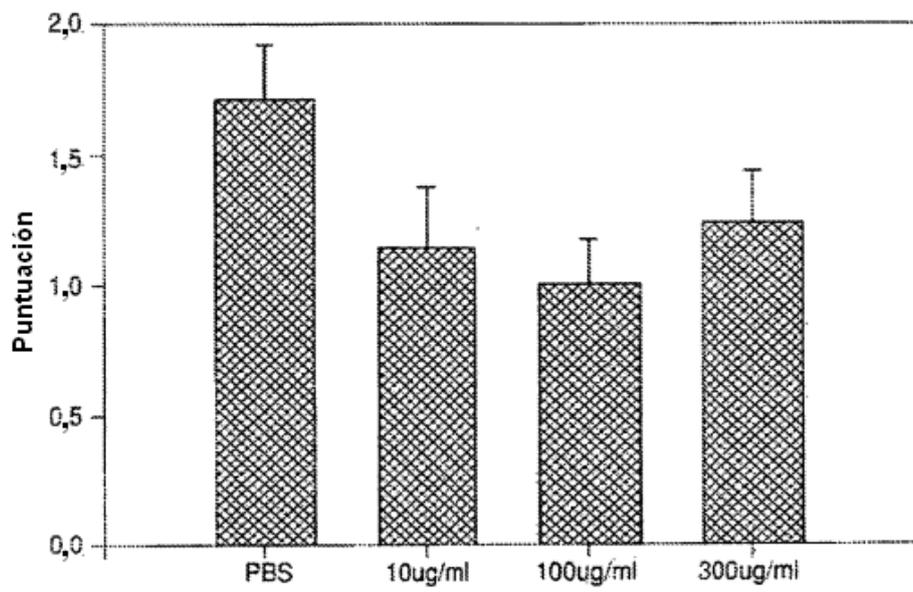


FIG. 17

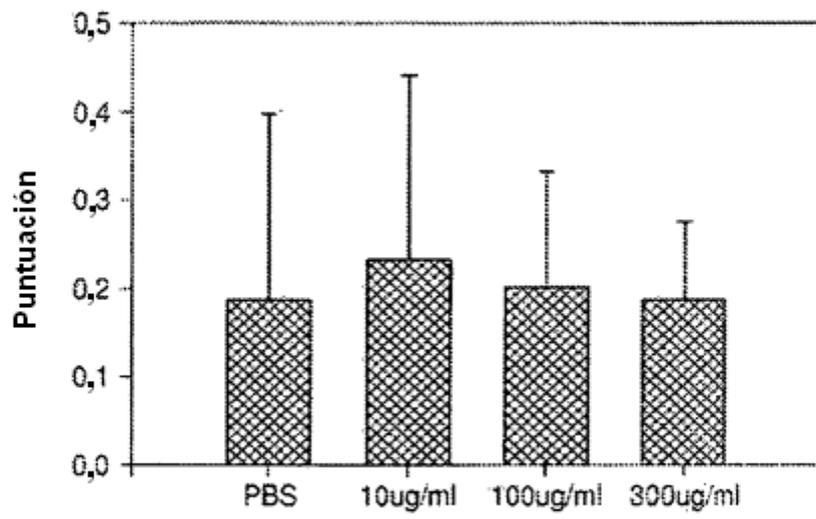


FIG. 18

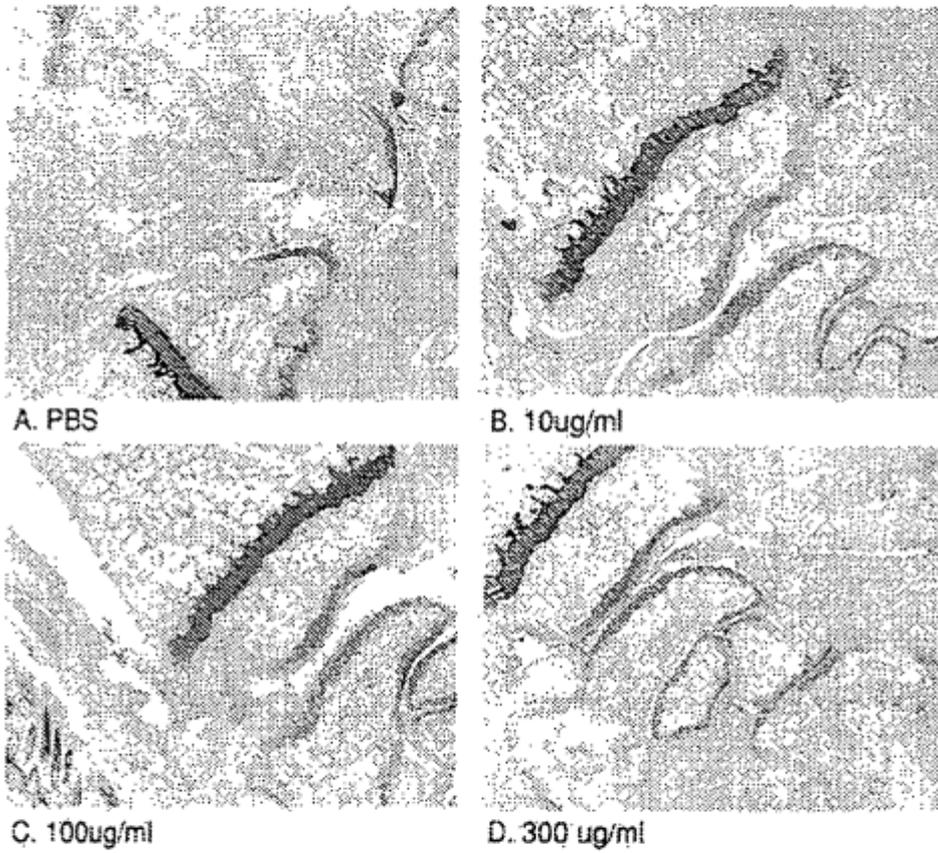


FIG. 19

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

10

- WO 2004016229 A2 [0005]
- US 2006078562 A [0005]
- US 20060057679 A1, O'Keefe, T. [0005]
- WO 60943994 A [0127]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

15

- GOOVA et al. *Am. J. Pathol.*, 2001, vol. 159, 513-525 [0005]
- PARK et al. *Nat Med.*, 1998, vol. 4 (9), 1025-31 [0005]
- 20 • ALTSCHUL et al. *Nucleic Acids Res*, 1997, vol. 25 (17), 3389-402 [0024]
- ZHANG et al. *Nucleic Acids Res*, 1998, vol. 26 (17), 3986-90 [0024]
- 25 • MIDDLETON, WI. ; BLECK ; GREGORY T. Gala Biotech, a business unit of Catalent Pharma Solutions. *Bioprocess*, September 2005, 1-7, gjournal.com [0042]
- URDAL et al. *J. Chromatog.*, 1984, vol. 296, 171 [0046]
- 30 • OBROSOVA IG ; DREL VR ; KUMAGAI AK ; SZABO C ; PACHER P ; STEVENS MJ. Early diabetes-induced biochemical changes in the retina: comparison of rat and mouse models. *Diabetologia*, October 2006, vol. 49 (10), 2525-33 [0067] [0084]
- 35 • JOUSSEN et al. *FASEB J.*, September 2004, vol. 18 (12), 1450-2 [0072]
- *Diabetes*, 2008, vol. 57, 1387-93 [0096]
- WOOLEY et al. *Journal of Experimental Medicine*, 1981, vol. 154, 688-700 [0101]
- WOOLEY. *Methods In Enzymology*, 1988, vol. 162, 361-373 [0101]
- STAINES et al. *British Journal of Rheumatology*, 1994, vol. 33 (9), 798-807 [0101]
- WOOLEY et al. *Arthritis Rheum*, 1993, vol. 36, 1305-1314 [0101]
- WOOLEY et al. *Journal of Immunology*, 1993, vol. 151, 6602-6607 [0101]
- HOFMANN et al. *Genes Immun*, 2002, vol. 3 (3), 123-135 [0102]