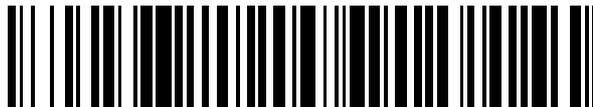


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 881**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/39** (2006.01)

**G01N 33/567** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**A61P 11/06** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2010 PCT/US2010/032007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO2010124058**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2010 E 10716439 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2421552**

54 Título: **Colágeno V para su uso en el tratamiento del asma**

30 Prioridad:

**22.04.2009 US 171705 P**

**02.12.2009 US 266048 P**

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

**22.06.2017**

73 Titular/es:

**INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND  
TECHNOLOGY CORPORATION (100.0%)  
518 Indiana Avenue  
Indianapolis, IN 46202, US**

72 Inventor/es:

**WILKES, DAVID, S.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 618 881 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

Colágeno V para su uso en el tratamiento del asma

### 5 Antecedentes de la invención

#### Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a composiciones para su uso en métodos para el tratamiento del asma. En particular, la invención se refiere al tratamiento del asma mediante la administración de colágeno de tipo V (colV) o sus fragmentos tolerogénicos.

#### Descripción de la técnica relacionada

15 El asma es un trastorno heterogéneo de las vías respiratorias que afecta a millones de personas. La inflamación, hipersensibilidad y obstrucción de las vías respiratorias caracterizan la afección. La enfermedad a menudo provoca espasmos del sistema de músculos lisos bronquiales y afecta al tracto respiratorio superior e inferior. Existen varias formas del asma, que se caracterizan por diversos grados de gravedad. El asma leve, por ejemplo, se define como breves episodios de respiración sibilante, con o sin disnea o tos. El asma moderadamente grave se define como una  
20 respiración sibilante y disnea, y puede presentarse con o sin tos y expectoración, pero, en general, interfiere con las actividades diarias y/o el sueño. El asma grave se caracteriza por una incapacitación debida a la disnea, y el paciente que lo padece generalmente es incapaz de comer o dormir con normalidad, está muy angustiado y se agota con frecuencia. Un trastorno denominado estado asmático es la forma más grave del asma y, en general, requiere cuidados hospitalarios intensivos e incluso puede ser mortal. La enfermedad puede aparecer como  
25 resultado de mecanismos alérgicos y no alérgicos.

Aunque existen varios tratamientos disponibles para aliviar los síntomas y las molestias asociadas con el asma, no existe cura. Además, los tratamientos actuales a menudo provocan efectos secundarios que exacerban las molestias y precipitan otras condiciones debilitantes. En general, el asma leve se trata con fármacos beta-adrenérgicos, así  
30 como con antihistaminas, en especial en el caso de niños, para evitar o anular los episodios esporádicos. El asma grave y moderadamente grave se tratan, en general, con agentes adrenérgicos y broncodilatadores, así como con corticosteroides. Otras acciones provocadas por los agentes antiasmáticos que limitan su uso amplio incluyen cefalea, fatiga, xerostomía, nerviosismo y, en algunos casos, adicción y abuso de sustancias. Recientes avances en la comprensión de la patogénesis y el tratamiento del asma se analizan más fondo en Am. J. Respir. Crit. Care Med.,  
35 2008, 15 de mayo, 177(10):1068-1073.

Debido a que el asma está igualmente extendido en niños y en adultos, son necesarios agentes que puedan tratar la enfermedad o, al menos, aliviar los síntomas que acompañan a la enfermedad, sin provocar efectos secundarios no deseables. La presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento del asma y otras  
40 ventajas, tal como se describe en la descripción detallada.

#### Breve resumen de la invención

45 Un aspecto de la presente invención proporciona un compuesto para su uso en un método para tratar el asma, que comprende administrar a un paciente con asma una cantidad terapéuticamente eficaz de colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos tolerogénicos. En una realización de los métodos, el colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos tolerogénicos, se administra por vía oral, y puede administrarse a una dosis de entre 0,1 mg y 0,5 mg. En otras realizaciones, el colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos tolerogénicos, se administra por vía intravenosa, mediante instilación intrapulmonar, mediante inhalación o por vía intramuscular. En otra realización más, el método  
50 comprende además administrar al paciente con asma un corticosteroide, un broncodilatador y/o un modificador de leucotrienos, u otro tratamiento conocido para el asma.

Otro aspecto de la invención proporciona un compuesto para su uso en un método para prevenir el desarrollo o el empeoramiento del asma en un sujeto que está en riesgo de desarrollar asma, que comprende administrar al sujeto  
55 una cantidad terapéuticamente eficaz de colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos tolerogénicos. En una realización, el colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos tolerogénicos, se administra por vía oral y, en ciertas realizaciones, puede administrarse a una dosis de entre 0,1 mg y 0,5 mg. En otra realización, el colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos tolerogénicos, se administra por vía intravenosa, mediante instilación intrapulmonar, mediante inhalación, por vía intramuscular, o mediante una combinación de una o más de estas vías.  
60

Un aspecto de la presente invención proporciona un método para identificar un paciente con asma como candidato a una terapia de tolerancia al colágeno V, que comprende poner en contacto al menos una porción de una muestra de sangre del paciente con colágeno V, o uno de sus fragmentos antigénicos; y medir el nivel de anticuerpos que se unen al colágeno V, o uno de sus fragmentos antigénicos (es decir, medir el nivel de anticuerpos específicos del colágeno de tipo V), en el que la presencia de anticuerpos unidos al colágeno V es indicativa de asma. A este respecto, el nivel de anticuerpos específicos del colágeno V puede emplearse junto con otros factores clínicos, tal  
65

como se describe en el presente documento, en el diagnóstico del asma. En una realización, el colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos antigénicos, se conjuga con una perla. En otra realización, la medición comprende poner en contacto los anticuerpos que se unen al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, con un anticuerpo anti-IgG marcado con fluorescencia; y detectar, mediante citometría de flujo, la cantidad de anticuerpo anti-IgG marcado con fluorescencia unido a los anticuerpos unidos al colágeno V.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para identificar un individuo en riesgo de desarrollar asma, que comprende: poner en contacto al menos una porción de una muestra de sangre del individuo con colágeno V, o uno de sus fragmentos antigénicos; y medir el nivel de anticuerpos que se unen al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos (es decir, medir el nivel de anticuerpos específicos del colágeno de tipo V); en el que la presencia de anticuerpos que se unen al colágeno V se asocia con un riesgo mayor que el esperado en un individuo sin anticuerpos que se unen al colágeno V. En una realización, el colágeno V, o uno de sus fragmentos antigénicos, se conjuga con una perla. En otra realización, la medición comprende poner en contacto los anticuerpos que se unen al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, con un anticuerpo anti-IgG marcado con fluorescencia; y detectar, mediante citometría de flujo, la cantidad de anticuerpo anti-IgG marcado con fluorescencia unido a los anticuerpos unidos al colágeno V.

En ciertas realizaciones de los métodos para diagnosticar o medir el riesgo de desarrollar asma, el anticuerpo anti-IgG empleado en los métodos detecta todos los subtipos de IgG. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-IgG detecta específicamente el subtipo IgG1, o el subtipo IgG2, o el subtipo IgG3, o el subtipo IgG4. A este respecto, puede producirse un cambio desde un subtipo a otro subtipo durante el desarrollo de la enfermedad y esto puede indicar un empeoramiento de la enfermedad. Por tanto, un aumento en un subtipo a lo largo del tiempo puede indicar el empeoramiento de la enfermedad.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para controlar el avance del asma en un individuo que comprende poner en contacto al menos una porción de una primera muestra de sangre del individuo con colágeno V, o uno de sus fragmentos antigénicos; medir el nivel de anticuerpos que se unen al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, en la primera muestra de sangre; poner en contacto al menos una porción de una segunda muestra de sangre del individuo extraída en un momento posterior con colágeno V, o uno de sus fragmentos antigénicos; medir el nivel de anticuerpos que se unen al colágeno V, o uno de sus fragmentos antigénicos en la segunda muestra de sangre; y comparar el nivel de anticuerpos que se unen al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, en la segunda muestra de sangre con el nivel de anticuerpos que se unen al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, en la primera muestra de sangre; en el que un aumento en el nivel de anticuerpos unidos al colágeno V en la segunda muestra, comparado con la primera muestra, es indicativo de un empeoramiento del asma, y una disminución en el nivel de anticuerpos unidos al colágeno V en la segunda muestra, comparado con la primera muestra, es indicativa de una mejoría del asma. Pueden emplearse otros indicadores clínicos del asma junto con los métodos proporcionados en el presente documento. En ciertas realizaciones, un aumento en los anticuerpos anti-colágeno V de un subtipo de IgG concreto (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) es indicativo de un avance del asma. En ciertas realizaciones, el colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos antigénicos, se conjuga con una perla. En otra realización, la medición comprende poner en contacto los anticuerpos que se unen al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, con un anticuerpo anti-IgG marcado con fluorescencia; y detectar, mediante citometría de flujo, la cantidad de anticuerpo anti-IgG marcado con fluorescencia unido a los anticuerpos unidos al colágeno V. En ciertas realizaciones de los métodos para controlar el avance, el anticuerpo anti-IgG detecta todos los subtipos de IgG. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-IgG detecta específicamente el subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes tras remitirse a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es una gráfica de barras que muestra niveles elevados de anticuerpos anti-colágeno de tipo V en pacientes con EPOC.

La figura 2 es una gráfica de barras que muestra niveles elevados de anticuerpos anti-colágeno de tipo V en pacientes con asma.

La figura 3 muestra la prevención de la hipersensibilidad de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina en ratones tras la administración intravenosa de colágeno V.  $n = 5$  en todos los grupos, excepto col V, en donde  $n = 2-5$  para cada punto de los datos.

Las figuras 4A-4E son gráficas de barras que muestran la inducción de transcripciones de IFN- $\gamma$  en células mononucleares pulmonares por la administración intravenosa de col(v). Se realizó una PCR cuantitativa para las citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$  e IL-10 mostradas. Solo Col(V) IV indujo transcripciones de IFN- $\gamma$  en células mononucleares de pulmón. Los datos representan el ARN reunido de células mononucleares de pulmón procedentes de 5 ratones en cada grupo.

**Descripción detallada de la invención**Colágeno de tipo V

5 La proteína de colágeno está formada por cadenas polipeptídicas compuestas de una secuencia repetida de aminoácidos que consisten principalmente en hidroxiprolina (Hyp), glicina (Gly) y prolina (Pro). El colágeno es una de las proteínas más predominantes que se encuentran en el cuerpo humano y comprende aproximadamente 80-85 % de la matriz extracelular (ECM) en la capa dérmica de tejido de piel normal (no herido).

10 Los colágenos se clasifican en varios tipos, basándose en la identidad de secuencia y la función. Las moléculas de colágeno de los tipos I, II, y III constituyen las fibras principales de la mayoría de las estructuras extracelulares de animales. El tipo I forma aproximadamente 90 % del colágeno del cuerpo y es el principal componente del hueso, la piel y los tendones. El tipo II constituye las principales fibras del cartílago. Las fibras de colágeno están dispuestas en placas rígidas en los huesos, en haces paralelos en los tendones, y en una malla densa en el cartílago. El tipo I y  
 15 cantidades más pequeñas del tipo III constituyen los tendones y la piel. Las moléculas de colágeno de tipo IV constituyen las fibras no estriadas muy finas presentes en las láminas basales. El colágeno de tipo V (colV) es un colágeno minoritario presente en el pulmón (Madri y Furthmayr, Human Pathology, 11:353-366, 1980) y está localizado en los tejidos conectivos peribronquiolares (Madri y Furthmayr, Am. J. Pathol., 94:323-332, 1979), los intersticios alveolares (Konomi *et al.*, 1984), y las membranas basales capilares (Madri y Furthmayr, 1979, mencionado anteriormente). Se conocen más de una docena de otros tipos de colágeno, pero no están tan bien  
 20 caracterizados.

Las cadenas polipeptídicas de colágeno se caracterizan por un dominio helicoidal central formado por tripletes de glicina-X-Y repetidos y dominios N-terminales y C-terminales globulares. Tres de estas cadenas están enrolladas  
 25 entre sí en una superhélice para generar una molécula de colágeno individual con aspecto de cuerda.

Trabajos previos han demostrado que la autoinmunidad contra el colV está asociada con la disfunción de aloinjerto crónica (que incluye la bronquiolitis obliterante, el síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS)), el rechazo de aloinjertos de pulmón y con el riesgo de desarrollar IPF (véase, por ejemplo, la patente de EEUU 7.348.005 y el  
 30 documento WO 2007/120947). Además, este trabajo demostró que la administración de colV induce tolerancia a aloantígenos y a colV (véase, por ejemplo, el documento WO 2007/120947; figura 10). Sin embargo, antes de la presente invención, no se ha demostrado ninguna asociación con la autoinmunidad contra colV en el asma.

Por tanto, la presente invención se refiere a la inducción de tolerancia al colV en pacientes con asma, o en sujetos  
 35 en riesgo de desarrollar esta enfermedad.

Las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas de colV son conocidas por los expertos en la técnica y están disponibles en bases de datos públicas. Los polinucleótidos y polipéptidos de colV ilustrativos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, colágeno de tipo V alfa 1 de *Homo sapiens* (COL5A1), ARNm secuencia de  
 40 referencia NCBI: NM\_000093.3 versión GI:89276750 (SEQ ID NO:1); preproteína de colágeno de tipo V alfa 1 [*Homo sapiens*]; n.º de registro NP\_000084, versión GI:89276751 (SEQ ID NO:2); colágeno de tipo V alfa 2 de *Homo sapiens* 2 (COL5A2), ARNm; n.º de registro NM\_000393, versión GI:89363016 (SEQ ID NO:3); preproteína de colágeno de tipo V alfa 2 [*Homo sapiens*]; n.º de registro NP\_000384, versión GI:89363017 (SEQ ID NO:4); colágeno de tipo V alfa 3 de *Homo sapiens* (COL5A3), ARNm; n.º de registro NM\_015719, NM\_015719.3, GI:110735434 (SEQ  
 45 ID NO:5); preproteína de colágeno de tipo V alfa 3 [*Homo sapiens*]; n.º de registro NP\_056534, versión NP\_056534.2, GI:110735435 (SEQ ID NO:6).

Tal como reconocerán los expertos en la técnica, el preprocolágeno se procesa en una célula para producir procolágeno, que es exportado desde la célula y finalmente se conforma en fibrillas y fibras de colágeno. Así, la presente invención contempla específicamente el procolágeno y otras formas procesadas o maduras de las proteínas de colágeno descritas en el presente documento. A este respecto, por ejemplo, los aminoácidos 1-26 de SEQ ID NO:4 se corresponden con el péptido señal que se escinde durante el procesamiento, los aminoácidos 27-1229 constituyen la cadena de colágeno alfa-2(V), y los aminoácidos 1230-1499 se corresponden con el propéptido C-terminal. Estas posiciones dentro de las secuencias específicamente descritas en el presente documento serán  
 50 reconocidas por los expertos en la técnica y están disponibles en diversas bases de datos públicas en las que se proporciona la anotación de las secuencias. También debe advertirse que ciertos aminoácidos de las proteínas de colágeno son modificados durante el procesamiento (por ejemplo, de prolina a hidroxiprolina). Se contemplan específicamente formas modificadas maduras de las cadenas del colágeno de tipo V, en particular las cadenas alfa-2, en el presente documento. Tal como se indicó en otro punto, el colágeno de tipo V y sus cadenas alfa para su uso  
 60 en la presente invención pueden purificarse a partir de una diversidad de fuentes o pueden producirse de modo recombinante.

Tal como se emplea en el presente documento, el término "polipéptido" se utiliza con su significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica del producto; por tanto, se incluyen los péptidos, los oligopéptidos y las proteínas dentro de la definición de polipéptidos, y estos términos pueden emplearse de modo intercambiable en el presente documento, a menos que se indique

específicamente lo contrario. Este término tampoco se refiere ni excluye las modificaciones que se producen después de la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no natural. Un polipéptido puede ser una proteína completa, o una de sus subsecuencias. Los polipéptidos de interés concretos en el contexto de esta invención son subsecuencias de aminoácidos que comprenden fragmentos tolerogénicos.

La presente invención, en otro aspecto, proporciona fragmentos de polipéptidos que comprenden al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 50, o 100 aminoácidos contiguos o más, que incluyen todas las longitudes intermedias, de las composiciones de polipéptidos de colágeno indicados en el presente documento, tales como los indicados en SEQ ID NO: 2, 4 o 6, o los codificados por una secuencia polinucleotídica indicada en una secuencia de SEQ ID NO: 1, 3 o 5.

En otro aspecto, la presente invención proporciona variantes de las composiciones de polipéptidos descritas en el presente documento. Los variantes de polipéptidos incluidos en general en la presente invención mostrarán generalmente al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o más de identidad (determinada como se describe a continuación) a lo largo de su longitud con una de las secuencias de polipéptidos indicadas en el presente documento.

En una realización, los fragmentos de polipéptidos y variantes proporcionados por la presente invención son inmunológicamente tolerogénicos, según se describe en el presente documento.

Un "variante" de polipéptido, tal como se emplea el término en el presente documento, es un polipéptido que generalmente se diferencia de un polipéptido descrito específicamente en el presente documento por una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Estas variantes pueden aparecer de modo natural o pueden generarse de manera sintética, por ejemplo, mediante la modificación de una o más de las anteriores secuencias de polipéptidos de la invención y la evaluación de su actividad tolerogénica tal como se describe en el presente documento y/o empleando cualquiera de una serie de técnicas muy conocidas en este campo.

En muchos casos, una variante contendrá sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es una sustitución en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de una forma en que los expertos en la técnica de la química de los péptidos esperarían que no cambiase sustancialmente la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido. Pueden realizarse modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y los polipéptidos de la presente invención y todavía se obtendría una molécula funcional que codificaría una variante o derivado de polipéptido con características deseables, por ejemplo, con características tolerogénicas. Cuando se desee alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear un equivalente, o incluso una porción o variante tolerogénica mejorada de un polipéptido de la invención, los expertos en la técnica generalmente cambiarán uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante según la tabla 1.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en la estructura de una proteína sin una pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, las regiones de unión al antígeno de anticuerpos o los sitios de unión sobre las moléculas sustrato. Puesto que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen la actividad funcional biológica de una proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones en la secuencia de aminoácidos en una secuencia de proteína y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente, y, no obstante, obtener una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla que puedan realizarse diversos cambios en las secuencias de los péptidos de las composiciones descritas, o las correspondientes secuencias de ADN que codifican dichos péptidos, sin una pérdida apreciable de su actividad o utilidad tolerogénica.

Tabla 1

Aminoácidos		Codones	
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU

Aminoácidos		Codones		
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU	
Triptófano	Trp	W	UGG	
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU	

Cuando se realizan dichos cambios, puede tomarse en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. En general, en la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a una proteína (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que, a su vez, define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en su hidrofobicidad y sus características de carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

En la técnica se sabe que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tengan una puntuación o índice hidropático similar y todavía se produciría una proteína con una actividad biológica similar, es decir, aún se obtiene una proteína con una funcionalidad biológica equivalente. Cuando se realizan estos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén dentro de  $\pm 2$ , se prefieren en particular los que estén dentro de  $\pm 1$ , y aún se prefieren más en particular los que estén dentro de  $\pm 0,5$ . En la técnica también se entiende que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse de modo eficaz basándose en la hidrofobicidad. La patente de EEUU 4.554.101 indica que el mayor promedio de hidrofobicidad local de una proteína, gobernada por la hidrofobicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína.

Tal como se detalla en la patente de EEUU 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofobicidad a los restos aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm$  1); glutamato (+3,0  $\pm$  1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5  $\pm$  1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofobicidad similar y aún así obtener una proteína biológicamente equivalente y, en particular, una proteína inmunológicamente equivalente. Cuando se realizan estos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofobicidad estén dentro de  $\pm 2$ , se prefieren en particular los que estén dentro de  $\pm 1$ , y aún se prefieren más en particular los que estén dentro de  $\pm 0,5$ .

Tal como se resumió anteriormente, las sustituciones de aminoácidos, por tanto, están basadas en general en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofobicidad, carga, tamaño y similares. Los expertos en la técnica conocen muy bien ejemplos de sustituciones que toman en cuenta diversas de las características anteriores y estas incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Además, cualquier polinucleótido puede modificarse aún más para aumentar la estabilidad *in vivo*. Las posibles modificaciones incluyen, pero sin limitación, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3'; el uso de enlaces fosforotioato o 2' O-metilo, en lugar de enlaces fosfodiesterasa, en el esqueleto; y/o la inclusión de bases no tradicionales, tales como inosina, queosina y wibutosina, así como las formas modificadas con acetilo, metilo, tio y otras formas modificadas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina.

Las sustituciones de aminoácidos también pueden realizarse basándose en similitudes en la polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobicidad, la hidrofobicidad y/o la naturaleza anfipática de los restos. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen la lisina y la arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares sin carga que tienen unos valores de hidrofobicidad similares incluyen la leucina, la isoleucina y la valina; la glicina y la alanina; la asparagina y la glutamina; y la serina, la treonina, la fenilalanina y la tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservadores incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante también puede contener, como alternativa o además, cambios no conservativos. En una realización preferida, las variantes de polipéptidos se diferencian de una secuencia nativa por la sustitución, delección o adición de cinco o menos aminoácidos. Las variantes también (o como alternativa) pueden ser modificados, por ejemplo, por la delección o la adición de aminoácidos que tengan una influencia mínima sobre la tolerogenicidad, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.

Tal como se indicó anteriormente, los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o conductora) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige, de modo cotraduccional o postraduccional, la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede estar conjugado con un conector u otra secuencia para facilitar la síntesis, la purificación o la identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede estar conjugado con una región Fc de una inmunoglobulina.

Cuando se comparan secuencias de polipéptidos, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para la correspondencia máxima, según se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan generalmente comparando las secuencias a través de una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en el cual una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia con el mismo número de posiciones contiguas después de haber alineado óptimamente las dos secuencias.

El alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación puede realizarse empleando el programa Megalign del paquete Lasergene de software bioinformático (DNASTAR, Inc., Madison, WI), empleando los parámetros por defecto. Este programa incluye varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978), A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships, en Dayhoff, M.O. (ed.), Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC, vol. 5, supl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990), Unified Approach to Alignment and Phylogenesis, pp. 626-645, Methods in Enzymology, vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., CABIOS, 5:151-153 (1989); Myers, E.W. y Muller W., CABIOS, 4:11-17 (1988); Robinson, E.D., Comb. Theor., 11:105 (1971); Saitou, N. Nei, M., Mol. Biol., Evol., 4:406-425 (1987); Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:726-730 (1983).

Como alternativa, el alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación puede realizarse por medio del algoritmo de identidad local de Smith y Waterman, Add. APL. Math., 2:482 (1981), por medio del algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 (1970), por medio de los métodos de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 2444 (1988), por medio de aplicaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 (1977), y Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 pueden utilizarse, por ejemplo, con los parámetros descritos en el presente documento para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos y los polipéptidos de la invención. Está disponible al público software para realizar los análisis BLAST a través de the National Center for Biotechnology Information. Para las secuencias de aminoácidos puede emplearse una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada disminuye en la cantidad X desde su máximo valor logrado; la puntuación acumulada llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento.

En una estrategia preferida, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la porción de la secuencia del polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de 20 % o menor, habitualmente del 5 al 15 %, o del 10 % al 12 %, comparado con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones ni deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece el resto aminoácido idéntico en ambas secuencias, para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Dentro de otras realizaciones ilustrativas, un polipéptido puede ser un polipéptido de fusión que comprende múltiples polipéptidos, tal como se describe en el presente documento, o que comprende al menos un polipéptido, tal como se describe en el presente documento, y una secuencia no relacionada, tal como un marcador de His para la purificación, o un péptido de transporte dirigido. Un compañero de fusión, por ejemplo, puede ayudar a la expresión de la proteína (un potenciador de la expresión) a unos rendimientos mayores que la proteína recombinante nativa. Pueden seleccionarse otros compañeros de fusión para aumentar la solubilidad del polipéptido o para permitir que el polipéptido pueda dirigirse a los compartimentos intracelulares deseados. Otros compañeros de fusión incluyen marcadores de afinidad, que facilitan la purificación del polipéptido. En ciertas realizaciones, un compañero de fusión aumenta la tolerogenicidad del polipéptido o aumenta su captación por las células. En otras realizaciones, un compañero de fusión comprende un potenciador de la respuesta inmunológica.

Los polipéptidos de fusión pueden prepararse, en general, empleando técnicas convencionales, que incluyen la conjugación química. Preferiblemente, un polipéptido de fusión se expresa como un polipéptido recombinante, lo cual permite la producción de niveles más altos, con relación a un polipéptido no fusionado, en un sistema de expresión. Brevemente, las secuencias de ADN que codifican los componentes del polipéptido pueden ensamblarse

por separado y acoplarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente del polipéptido se acopla, con o sin un conector peptídico, con el extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente del polipéptido de modo que las fases de lectura de las secuencias quedan en fase. Esto permite la traducción en un único polipéptido de fusión que conserva la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

Puede emplearse una secuencia conectora peptídica para separar el primer y el segundo componente del polipéptido a una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliegue en su estructura secundaria y terciaria. Esta secuencia de conector peptídico se incorpora en el polipéptido de fusión empleando técnicas convencionales muy conocidas en la técnica. Las secuencias de conectores peptídicos adecuadas pueden elegirse basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pueda interactuar con los epítomos funcionales en el primer y el segundo polipéptido; y (3) la falta de restos hidrófobos o cargados que puedan reaccionar con los epítomos funcionales del polipéptido. Las secuencias de conectores peptídicos preferidos contienen restos Gly, Asn y Ser. También pueden emplearse otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala, en la secuencia del conector. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de modo útil como conectores incluyen las descritas en Maratea *et al.*, Gene, 40:39-46, 1985; Murphy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83:8258-8262, 1986; patente de EEUU n.º 4.935.233 y patente de EEUU n.º 4.751.180. La secuencia del conector puede tener una longitud, en general, de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos. No son necesarias secuencias de conectores cuando el primer y el segundo polipéptido contengan regiones N-terminales de aminoácidos no esenciales que puedan emplearse para separar los dominios funcionales y evitar la interferencia estérica.

Las secuencias de ADN acopladas están unidas operablemente a elementos reguladores de la transcripción o de la traducción adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión del ADN están localizados solo en la dirección 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De modo similar, los codones de terminación requeridos para terminar la traducción y las señales de terminación de la transcripción solo están presentes en la dirección 3' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

Una realización de la invención implica polipéptidos de fusión y los polinucleótidos que los codifican, en los que el compañero de fusión comprende una señal de dirección capaz de dirigir un polipéptido al compartimento endosómico/lisosómico, tal como se describe en la patente de EEUU n.º 5.633.234. Un polipéptido tolerogénico de la invención, cuando está acoplado con esta señal de dirección, se asociará con más eficacia a las moléculas de MHC de clase II y, con ello, proporcionará una estimulación in vivo potenciada de las células T CD4+ apropiadas específicas para el polipéptido.

Los polipéptidos de la invención se preparan empleando cualquiera de una diversidad de técnicas sintéticas y/o recombinantes conocidas, y estas últimas se describen con más detalle a continuación. Los polipéptidos, las porciones y otros variantes que presenten, en general, menos de aproximadamente 150 aminoácidos pueden generarse por medios sintéticos, empleando técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica. En un ejemplo ilustrativo, estos polipéptidos se sintetizan empleando cualquiera de las técnicas en fase sólida disponibles en el mercado, tales como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, en el que los aminoácidos son añadidos secuencialmente a una cadena de aminoácidos en crecimiento. Véase Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2146, 1963. El equipo para la síntesis automática de polipéptidos está disponible en el mercado en distribuidores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), y puede aplicarse según las instrucciones del fabricante.

En general, las composiciones de polipéptidos (incluyendo polipéptidos de fusión) de la invención están aisladas. Un polipéptido "aislado" es un polipéptido que se retira de su entorno original. Por ejemplo, una proteína o un polipéptido natural está aislado si está separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente, estos polipéptidos también están purificados, por ejemplo, son al menos aproximadamente 90 % puros, más preferiblemente al menos aproximadamente 95 % puros, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99 % puros.

La proteína de ColV puede purificarse a partir de una diversidad de fuentes o puede obtenerse de una fuente comercial (Collaborative Biomedical Products/Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EEUU). Para practicar algunas de las realizaciones, puede ser necesario obtener un colágeno puro o parcialmente puro, o uno de sus fragmentos tolerogénicos, epítomos o porciones antigénicas. Estos materiales, por ejemplo, el colágeno de tipo V, o sus fragmentos, pueden obtenerse con facilidad a través de una diversidad de medios, incluyendo, pero sin limitación fuentes animales, cadáveres humanos o medios recombinantes. Otros métodos incluyen digestiones parciales del colágeno, tal como el colágeno de tipo V. A este respecto, el colágeno de tipo V humano puede extraerse de placenta humana u otras fuentes y purificarse por medio de precipitación diferencial con NaCl (Seyer y Kang, 1989). Por ejemplo, los tejidos placentarios se pican, se lavan y se suspenden en ácido acético 0,5 M que contiene NaCl 0,2 M, y se digieren con pepsina a 4 °C. Los sobrenadantes se aspiran de las muestras de ensayo centrifugados, el sedimento se recoge y se repite el procedimiento de extracción. Se combinan los sobrenadantes de las dos digestiones y se purifica el col(V) de los sobrenadantes mediante una precipitación diferencial con NaCl en ácido acético 0,5 M (Smith *et al.*, 1985; Seyer y Kang, 1989). El colágeno de tipo V en general es soluble en NaCl

0,7 M y precipita en NaCl 1,2 M.

En las realizaciones en que sea necesario purificar las cadenas  $\alpha(V)$ , el ciclo de solubilización en ácido acético y precipitación con NaCl puede repetirse hasta que se obtenga una preparación de colágeno de tipo V con una proporción de cadena  $\alpha 1(V)/\alpha 2(V)$  de aproximadamente 2, según se determina mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Smith *et al.*, 1985), u otro método apropiado conocido por los expertos en la técnica. La separación de  $\alpha 1(V)$  de  $\alpha 2(V)$  puede lograrse por medio de cromatografía en DEAE-celulosa (Seyer y Kang, 1989) u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos en Protein Purification Protocols, ed. Shawn Doonan, Humana Press, 1996. Las cadenas  $\alpha 1(V)$  y  $\alpha 2(V)$  pueden eluirse de la columna y la pureza puede confirmarse mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, tal como se ha indicado previamente (Smith, Jr. *et al.*, 1985). El col(V) intacto, o las cadenas  $\alpha 1(V)$  y  $\alpha 2(V)$  pueden diluirse en PBS (0,5 mg/ml) u otro tampón apropiado hasta que se empleen.

La presente invención, en ciertas realizaciones, proporciona polinucleótidos que codifican las proteínas de colágeno de la presente invención. Se indican ejemplos de polinucleótidos en SEQ ID NO: 1, 3 y 5, y sus fragmentos, que codifican un fragmento tolerogénico de una proteína de colágeno, tal como se describe en el presente documento.

Los términos "ADN" y "polinucleótido" se emplean fundamentalmente de modo intercambiable en el presente documento para indicar una molécula de ADN que se ha aislado y separado totalmente del ADN genómico total de una especie concreta. "Aislado", tal como se emplea en el presente documento, significa que un polinucleótido está sustancialmente separado de otras secuencias codificantes, y que la molécula de ADN ya no contiene porciones grandes de ADN codificador no relacionado, tales como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de polipéptidos. Por supuesto, esto se refiere a la molécula de ADN tal como se aísla originariamente, y no excluye genes o regiones codificantes que hayan sido posteriormente añadidas al segmento por el ser humano.

Tal como entenderán los expertos en la técnica, las composiciones de polinucleótidos de esta invención pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y codificadas por plásmidos, y segmentos de genes modificados más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para que expresen, proteínas, polipéptidos, péptidos y similares. Estos segmentos pueden estar aislados en la naturaleza o modificarse de modo sintético por el ser humano.

Las composiciones de polinucleótidos de la presente invención pueden identificarse, prepararse y/o manipularse empleando cualquiera de una diversidad de técnicas bien establecidas (véase, en general, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausubel *et al.* (2001, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY) y otras referencias bibliográficas similares).

Están disponibles muchos procesos dependientes de moldes para amplificar una secuencia diana de interés presente en una muestra. Uno de los métodos de amplificación más conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR<sup>TM</sup>), que se describe en detalle en las patentes de EEUU n<sup>os</sup>. 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159.

Cualquiera de una serie de otros procesos dependientes de moldes, muchos de los cuales son variaciones de la técnica de amplificación de PCR<sup>TM</sup>, son conocidos y están disponibles en la técnica. Por ejemplo, algunos de estos métodos incluyen la reacción en cadena de la ligasa (denominada LCR), descrita, por ejemplo, en la solicitud de patente europea publicada n.º 320.308 y en la patente de EEUU n.º 4.883.750; Qbeta replicasa, descrita en la solicitud de patente internacional PCT publicada n.º PCT/US87/00880; la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) y la reacción de reparación de cadenas (RCR). Otros métodos de amplificación se describen en la solicitud de patente del Reino Unido n.º 2.202.328, y en la solicitud de patente internacional PCT publicada n.º PCT/US89/01025. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS) (solicitud de patente internacional PCT publicada n.º WO 88/10315), que incluyen la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y 3SR. La solicitud de patente europea publicada n.º 329.822 describe un proceso de amplificación de ácidos nucleicos que implica la síntesis cíclica de ARN monocatenario ("ARNmc"), ADNmc, y ADN bicatenario (ADNbc). La solicitud de patente internacional PCT publicada n.º WO 89/06700 describe un esquema de amplificación de secuencias de ácidos nucleicos basado en la hibridación de una secuencia de promotor/cebador con un ADN monocatenario ("ADNmc") diana, seguido de la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Los expertos en la técnica también conocen otros métodos de amplificación, tales como "RACE" (Frohman, 1990), y "PCR anclada" (Ohara, 1989).

Una porción amplificada de un polinucleótido de la presente invención puede emplearse para aislar un gen de longitud completa a partir de una biblioteca adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de tumor) empleando técnicas muy conocidas.

Tal como reconocerán los expertos en la técnica, los polinucleótidos de la invención pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o de ARN. Las moléculas de ARN pueden incluir moléculas de ARNnh, que contienen intrones y se corresponden con una

molécula de ADN uno a uno, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Otras secuencias codificantes o no codificantes pueden estar presentes, aunque no es necesario, dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede estar unido, aunque no es necesario, a otras moléculas y/o materiales de soporte.

- 5 Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido/proteína de la invención, o una de sus porciones) o pueden comprender una secuencia que codifica una variante o derivado, preferiblemente, una variante o derivado tolerogénicos, de dicha secuencia.

10 En otras realizaciones relacionadas, la presente invención proporciona variantes de polinucleótidos que poseen una identidad sustancial con las secuencias descritas en el presente documento en SEQ ID NO: 1, 3 y 5, por ejemplo, las que comprenden al menos 70 % de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor de identidad de secuencia, comparado con una secuencia polinucleotídica de esta invención, empleando los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, análisis BLAST empleando parámetros convencionales, tal como se describe a continuación). Los expertos en la técnica  
15 reconocerán que estos valores pueden ajustarse de modo apropiado para determinar la correspondiente identidad de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos tomando en cuenta la degeneración de los codones, la similitud de los aminoácidos, la colocación de la fase de lectura y similares.

20 Generalmente, los variantes de polinucleótidos contendrán una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, preferiblemente de modo que la actividad tolerogénica del polipéptido codificado por la variante del polinucleótido no disminuya sustancialmente, con relación a un polipéptido codificado por una secuencia polinucleotídica específicamente indicada en el presente documento. También debe entenderse que el término "variantes" incluye genes homólogos de origen xenogénico.

25 En otras realizaciones, la presente invención proporciona fragmentos polinucleotídicos que comprenden o consisten en diversas longitudes de tramos contiguos de secuencia idénticos o complementarios con una o más de las secuencias descritas en el presente documento. Por ejemplo, en esta invención se proporcionan polinucleótidos que comprenden o consisten en al menos aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 o 1000 o más nucleótidos contiguos de una o más de las secuencias descritas en el presente documento, así como  
30 todas las longitudes intermedias incluidas. Se entenderá con facilidad que las "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores indicados, tales como 16, 17, 18, 19, etc.; 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los números enteros entre 200-500; 500-1.000, y similares. Una secuencia polinucleotídica, tal como se describe en el presente documento, puede ser extendida en uno o ambos extremos por nucleótidos adicionales que no se encuentran en la  
35 secuencia nativa. Esta secuencia adicional puede consistir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos en cada extremo de la secuencia descrita o en ambos extremos de la secuencia descrita.

40 En otra realización de la invención, se proporcionan composiciones de polinucleótidos que pueden hibridarse en condiciones de rigurosidad moderada a alta con una secuencia polinucleotídica proporcionada en el presente documento, o uno de sus fragmentos, o una de sus secuencias complementarias. Las técnicas de hibridación son muy conocidas en la técnica de la biología molecular. Como ejemplo, unas condiciones de rigurosidad moderada adecuadas para ensayar la hibridación de un polinucleótido de esta invención con otros polinucleótidos incluyen un prelavado en una disolución de SSC 5X, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); una hibridación a 50 °C-60 °C, SSC 5X, durante la noche; seguido de dos lavados a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2X, 0,5X y 0,2X que  
45 contiene SDS al 0,1 %. Los expertos en la técnica entenderán que la rigurosidad de la hibridación puede manipularse con facilidad, tal como alterando el contenido en sales de la disolución de hibridación y/o la temperatura a la cual se realiza la hibridación. Por ejemplo, en otra realización, unas condiciones de alta rigurosidad adecuadas incluyen las descritas anteriormente, con la excepción de que la temperatura de hibridación aumenta, por ejemplo, hasta 60-65 °C o 65-70 °C.

50 En una realización, estas variantes de polinucleótidos codifican polipéptidos que presentan un nivel de actividad tolerogénica de al menos aproximadamente 50 %, preferiblemente al menos aproximadamente 70 %, y más preferiblemente al menos aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más, de la de una secuencia de polipéptido específicamente indicada en el presente documento.

55 Los polinucleótidos de la presente invención, o sus fragmentos, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, otros sitios de enzimas de restricción, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes y similares, de modo que su longitud global puede variar considerablemente. Por tanto, se contempla que puede  
60 emplearse un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferiblemente limitada por la facilidad de preparación y uso del protocolo de ADN recombinante previsto. Por ejemplo, se contemplan unos ejemplos de segmentos polinucleotídicos con unas longitudes totales de aproximadamente 10.000, aproximadamente 5000, aproximadamente 3000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 1.000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 pares de bases de  
65 longitud y similares (incluyendo todas las longitudes intermedias) como útiles en muchas aplicaciones de esta invención.

5 Cuando se comparan secuencias polinucleotídicas, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para la correspondencia máxima, según se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan generalmente comparando las secuencias a través de una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en el cual una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia con el mismo número de posiciones contiguas después de haber alineado óptimamente las dos secuencias.

10 El alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación puede realizarse empleando el programa Megalign del paquete Lasergene de software bioinformático (DNASTAR, Inc., Madison, WI), empleando los parámetros por defecto. Este programa incluye varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978), A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships, en Dayhoff, M.O. (ed.), Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC, vol. 5, supl. 3, pp. 345-358; Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenesis, pp. 626-645 (1990); Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., CABIOS, 5:151-153 (1989); Myers, E.W. and Muller W., CABIOS 4:11-17 (1988); Robinson, E.D., Comb. Theor., 11:105 (1971); Saitou, N. Nei, M., Mol. Biol., Evol., 4:406-425 (1987); Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:726-730 (1983).

25 Como alternativa, el alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación puede realizarse por medio del algoritmo de identidad local de Smith y Waterman, Add. APL. Math., 2:482 (1981), por medio del algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 (1970), por medio de los métodos de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 2444 (1988), por medio de aplicaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

30 Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 (1977), y Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 pueden utilizarse, por ejemplo, con los parámetros descritos en el presente documento para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos de la invención. El software para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través de the National Center for Biotechnology Information. En un ejemplo ilustrativo, las puntuaciones acumuladas pueden calcularse empleando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos apareados; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos desapareados; siempre <0). La extensión de aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada disminuye en la cantidad X desde su máximo valor logrado; la puntuación acumulada llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) emplea, por defecto, una longitud de palabra (W) de 11, y una esperanza (E) de 10, y los alineamientos de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:10915 (1989)) emplean (B) de 50, una esperanza (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras.

45 Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de 20 % o menor, habitualmente del 5 al 15 %, o del 10 % al 12 %, comparado con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones ni deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparecen bases de ácido nucleico idénticas en ambas secuencias, para producir el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

55 Los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido, tal como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos presentan una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de los codones son contemplados específicamente por la presente invención. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden tener una estructura o una función alteradas, aunque no necesariamente. Los alelos pueden identificarse empleando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparaciones con secuencias de bases de datos).

Por tanto, en otra realización de la invención, se emplea una estrategia de mutagénesis, tal como la mutagénesis específica de sitio, para la preparación de variantes y/o derivados tolerogénicos de los polipéptidos descritos en el presente documento. Mediante esta estrategia pueden realizarse modificaciones específicas en una secuencia polipeptídica a través de la mutagénesis de los polinucleótidos subyacentes que la codifican. Estas técnicas proporcionan una estrategia sencilla para preparar y ensayar variantes de secuencia, por ejemplo, incorporando una o más de las anteriores consideraciones, mediante la introducción de uno o más cambios en la secuencia de nucleótidos del polinucleótido.

La mutagénesis específica de sitio permite la producción de mutantes mediante el uso de secuencias oligonucleotídicas específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador con el suficiente tamaño y complejidad de secuencia como para formar un dúplex estable a ambos lados de la zona de unión de la delección que se está atravesando. Las mutaciones pueden emplearse en una secuencia polinucleotídica seleccionada para mejorar, alterar, disminuir, modificar o cambiar de otro modo las propiedades del propio polinucleótido y/o para alterar las propiedades, la actividad, la composición, la estabilidad o la secuencia primaria del polipéptido codificado.

En ciertas realizaciones de la presente invención, los inventores contemplan la mutagénesis de las secuencias polinucleotídicas descritas para alterar una o más propiedades del polipéptido codificado, tales como la tolerogenicidad de un polipéptido. Las técnicas de mutagénesis específica de sitio son muy conocidas en la técnica y se emplean mucho para crear variantes de polipéptidos y de polinucleótidos. Por ejemplo, la mutagénesis específica de sitio a menudo se emplea para alterar una porción específica de una molécula de ADN. En estas realizaciones, se emplea un cebador que generalmente comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y con aproximadamente 5 a aproximadamente 10 restos a ambos lados de la zona de unión de la secuencia que se está alterando.

Como apreciarán los expertos en la técnica, las técnicas de mutagénesis específica de sitio a menudo han empleado un vector de fago, que existe en forma monocatenaria y bicatenaria. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos pueden obtenerse en el mercado con facilidad y su uso es muy conocido, en general, por los expertos en la técnica. En la mutagénesis dirigida también se emplean habitualmente plásmidos bicatenarios, con lo que se elimina la etapa de transferir el gen de interés desde un plásmido a un fago.

En general, la mutagénesis dirigida según la presente se realiza obteniendo, en primer lugar, un vector monocatenario o separando las dos hebras de un vector bicatenario que incluye, dentro de su secuencia, una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Se prepara un cebador oligonucleotídico que porta la secuencia mutada deseada, en general de modo sintético. Después, este cebador se acopla con el vector monocatenario y se somete a enzimas de polimerización del ADN, tales como el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli*, para completar la síntesis de la hebra que porta la mutación. Así, se forma un heterodúplex en el que una hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hebra porta la mutación deseada. Después, este vector de heterodúplex se emplea para transformar las células apropiadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan los clones que incluyen los vectores recombinantes que portan la disposición de secuencia mutada.

La preparación de variantes de secuencia de los segmentos de ADN que codifican un péptido seleccionados empleando la mutagénesis dirigida proporciona un medio para producir especies potencialmente útiles y no se pretende que sea limitante, puesto que existen otras formas en las que pueden obtenerse variantes de péptidos y las secuencias de ADN que los codifican. Por ejemplo, pueden tratarse vectores recombinantes que codifican la secuencia del péptido deseado con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia. Los detalles específicos con respecto a estos métodos y protocolos se encuentran en las indicaciones de Maloy *et al.*, 1994; Segal, 1976; Prokop y Bajpai, 1991; Kuby, 1994; y Maniatis *et al.*, 1982.

Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "procedimiento de mutagénesis dirigida a oligonucleótido" se refiere a procesos dependientes de moldes y la propagación mediada por vectores que producen un aumento en la concentración de una molécula de ácido nucleico específica con relación a su concentración inicial, o que producen un aumento en la concentración de una señal detectable, tal como una amplificación. Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "procedimiento de mutagénesis dirigida a oligonucleótido" pretende indicar un proceso que implica la extensión dependiente de molde de una molécula de cebador. La expresión proceso dependiente de molde se refiere a la síntesis de ácido nucleico de una molécula de ARN o ADN, en la que la secuencia de la hebra recién sintetizada del ácido nucleico viene dictada por las reglas, muy conocidas, del apareamiento de bases complementarias (véase, por ejemplo, Watson, 1987). Generalmente, las metodologías mediadas por vectores implican la introducción del fragmento de ácido nucleico en un vector de ADN o ARN, la amplificación clonal del vector, y la recuperación del fragmento de ácido nucleico amplificado. Se proporcionan ejemplos de dichas metodologías en la patente de EEUU n.º 4.237.224.

En otra estrategia para la producción de variantes de polipéptidos de la presente invención, puede emplearse la recombinación de secuencia recursiva, tal como se describe en la patente de EEUU n.º 5.37.458. En esta estrategia, se realizan ciclos iterativos de recombinación y exploración o selección para que "evolucionen" variantes de

polinucleótidos individuales de la invención que tengan, por ejemplo, una actividad tolerogénica potenciada.

En otras realizaciones de la invención, las secuencias polinucleotídicas, o sus fragmentos, que codifican los polipéptidos de la invención, o sus proteínas de fusión o equivalentes funcionales, pueden emplearse en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido en células hospedadoras apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, pueden producirse otras secuencias de ADN que codifiquen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos, o una secuencia funcionalmente equivalente, y estas secuencias pueden utilizarse para clonar y expresar un polipéptido concreto.

Tal como entenderán los expertos en la técnica, puede resultar ventajoso, en algunos casos, producir secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que posean codones que no aparecen en la naturaleza. Por ejemplo, pueden seleccionarse los codones preferidos por un hospedador procarionta o eucarionta concreto para aumentar la tasa de expresión de proteínas o para producir una transcripción de ARN recombinante que tenga propiedades deseables, tales como una semivida más larga que la de una transcripción generada a partir de la secuencia de origen natural.

Además, las secuencias polinucleotídicas de la presente invención pueden modificarse empleando métodos conocidos en general en la técnica para alterar las secuencias que codifican polipéptidos por una diversidad de razones, que incluyen, pero sin limitación, alteraciones que puedan modificar la clonación, el procesamiento y/o la expresión del producto génico. Por ejemplo, puede emplearse el reordenamiento del ADN por medio de fragmentación aleatoria y reensamblaje con PCR de los fragmentos de genes y oligonucleótidos sintéticos para modificar las secuencias de nucleótidos. Además, la mutagénesis dirigida específica de sitio puede emplearse para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, cambiar la preferencia de codones, producir variantes de corte y empalme, o introducir mutaciones, etc.

En otra realización de la invención, secuencias de ácidos nucleicos naturales, modificadas o recombinantes pueden acoplarse a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para seleccionar bibliotecas de péptidos para encontrar inhibidores de la actividad de un polipéptido, puede resultar útil codificar una proteína quimérica que pueda ser reconocida por un anticuerpo disponible en el mercado. Una proteína de fusión también puede modificarse para que contenga un sitio de escisión localizado entre la secuencia codificante del polipéptido y la secuencia de la proteína heteróloga, de modo que el polipéptido pueda escindirse y purificarse del resto heterólogo.

Pueden sintetizarse secuencias que codifican un polipéptido deseado, completo o en parte, empleando métodos químicos muy conocidos en la técnica (véase Caruthers, M. H. *et al.* (1980), Nucl. Acids Res. Symp. Ser., 215-223; Horn, T. *et al.* (1980), Nucl. Acids Res. Symp. Ser., 225-232). Como alternativa, la propia proteína puede producirse empleando métodos químicos para sintetizar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, o de una de sus porciones. Por ejemplo, la síntesis peptídica puede realizarse empleando diversas técnicas en fase sólida (Roberge, J. Y. *et al.* (1995), Science, 269:202-204) y puede lograrse una síntesis automática empleando, por ejemplo, el sintetizador de péptidos ABI 431A (Perkin Elmer, Palo Alto, CA).

Un péptido recién sintetizado puede purificarse sustancialmente por medio de una cromatografía líquida de alta resolución preparativa (por ejemplo, Creighton, T. (1983), Proteins, Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., Nueva York, N.Y.) u otras técnicas comparables disponibles en la técnica. La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse por medio del análisis o secuenciación de los aminoácidos (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman). Además, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, o cualquiera de sus partes, puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse, empleando métodos químicos, con secuencias procedentes de otras proteínas, o de cualquiera de sus partes, para producir una variante de polipéptido.

Para expresar un polipéptido deseado, las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido, o equivalentes funcionales, pueden insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada. Pueden emplearse métodos que son muy conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de la transcripción y la traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y la recombinación genética *in vivo*. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook, J. *et al.* (1989), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y en Ausubel *et al.* (2001-2008 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY).

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de vector de expresión/hospedador para contener y expresar secuencias polinucleotídicas. Estos incluyen, pero sin limitación microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos recombinantes, plásmidos o cosmídicos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacteriana (por ejemplo, plásmidos de Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son las regiones no traducidas del vector (potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3') que interaccionan con las proteínas celulares del hospedador para realizar la transcripción y la traducción. Estos elementos varían en potencia y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y hospedador utilizado, puede emplearse cualquiera de una serie de elementos de la transcripción y la traducción adecuados, que incluyen promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden emplearse promotores inducibles, tales como el promotor híbrido lacZ del fagémido pBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) o el plásmido pSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) y similares. En sistemas de células de mamífero, en general se prefieren promotores de genes de mamífero o de virus de mamífero. Si resulta necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, pueden emplearse ventajosamente vectores basados en SV40 o EBV, empleados con un marcador seleccionable apropiado.

En sistemas bacterianos, puede seleccionarse cualquiera de una serie de vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando sean necesarias grandes cantidades, por ejemplo, para la inducción de anticuerpos, pueden utilizarse vectores que dirijan un alto nivel de expresión de las proteínas de fusión que se purifiquen con facilidad. Estos vectores incluyen, pero sin limitación los vectores de clonación y expresión multifuncionales de *E. coli*, tales como pBLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia que codifica el polipéptido de interés puede acoplarse al vector en fase con secuencias para el amino-terminal Met y los 7 restos siguientes de  $\beta$ -galactosidasa, de modo que se produce una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke, G. y S. M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509); y similares. También pueden emplearse los vectores pGEX (Promega, Madison, Wis.) para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, estas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse con facilidad a partir de células lisadas mediante la adsorción a perlas de glutatión-agarosa, seguido de una elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas preparadas en estos sistemas pueden diseñarse para que incluyan sitios de escisión de proteasas de heparina, trombina, o factor XA para que el polipéptido clonado de interés pueda ser liberado del resto GST a voluntad.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pueden emplearse una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, tales como factor alfa, alcohol oxidasa, y PGH. Para un análisis, véase Ausubel *et al.* (mencionado anteriormente) y Grant *et al.* (1987), *Methods Enzymol.*, 153:516-544.

En los casos en que se emplean vectores de expresión en plantas, la expresión de las secuencias que codifican los polipéptidos puede ser dirigida por cualquiera de una serie de promotores. Por ejemplo, pueden emplearse promotores víricos, tales como los promotores 35S y 19S de CaMV, solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu, N. (1987), *EMBO J.*, 6:307-311. Como alternativa, pueden utilizarse promotores vegetales, tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi, G. *et al.* (1984), *EMBO J.*, 3:1671-1680; Broglie, R. *et al.* (1984), *Science*, 224:838-843; y Winter, J. *et al.* (1991), *Results Probl. Cell Differ.*, 17:85-105). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales por medio de una transformación de ADN directa o una transfección mediada por patógenos. Estas técnicas se describen en una serie de artículos que pueden consultarse (véase, por ejemplo, Hobbs, S. o Murry, L. E. en McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992), McGraw Hill, Nueva York, N.Y.; pp. 191-196).

También puede utilizarse un sistema de insecto para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en uno de estos sistemas se emplea el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido pueden clonarse en una región no fundamental del virus, tal como el gen de polihedrina, y colocarse bajo el control del promotor de polihedrina. La inserción correcta de la secuencia que codifica el polipéptido hará que el gen de polihedrina se inactive y se produzcan virus recombinantes que carecen de proteína de la envoltura. Después, los virus recombinantes pueden emplearse para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia*, en las que el polipéptido de interés puede expresarse (Engelhard, E. K. *et al.* (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:3224-3227).

En células hospedadoras de mamífero, están disponibles, en general, una serie de sistemas de expresión basados en virus. Por ejemplo, en los casos en que se emplee un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés pueden acoplarse en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y una secuencia líder tripartita. Puede emplearse la inserción en una región no fundamental E1 o E3 del genoma vírico para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células hospedadoras infectadas (Logan, J. y Shenk, T. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:3655-3659). Además, pueden utilizarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.

También pueden utilizarse señales de inicio específicas para lograr una traducción más eficaz de las secuencias que codifican un polipéptido de interés. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes. En los casos en que se insertan secuencias que codifican el polipéptido, su codón de inicio y secuencias cadena arriba en el vector de expresión adecuado, puede que no sean necesarias otras señales de control de la transcripción o traducción. Sin embargo, en los casos en que solo se inserta una secuencia codificante, o una de sus porciones,

deben proporcionarse señales de control de la traducción exógenas incluyendo el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debe estar en la fase de lectura correcta para asegurar la traducción de la inserción completa. Los elementos traduccionales y los codones de inicio exógenos pueden proceder de diversas fuentes, tanto naturales como sintéticas. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores que son apropiados para el sistema celular concreto que se está usando, tales como los descritos en la bibliografía (Scharf, D. *et al.* (1994), *Results Probl. Cell Differ.*, 20:125-162).

Además, puede elegirse una cepa de célula hospedadora por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Estas modificaciones del polipéptido incluyen, pero sin limitación acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. También puede utilizarse el procesamiento postraduccional que escinde una forma "prepro" de la proteína para facilitar la inserción, el plegamiento y/o la función correctos. Pueden elegirse diferentes células hospedadoras, tales como CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293 y WI38, que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para estas actividades postraduccionales, para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, en general se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares que expresan de forma estable un polinucleótido de interés pueden transformarse empleando vectores de expresión que pueden contener orígenes de la replicación víricos y/o elementos de expresión endógenos y un gen de un marcador seleccionable en el mismo vector o en otro vector distinto. Después de la introducción del vector, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El objetivo del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de las células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Los clones resistentes de las células transformadas de modo estable pueden hacerse proliferar empleando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

Puede utilizarse cualquiera de una serie de sistemas de selección para recuperar las líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero sin limitación los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler, M. *et al.* (1977), *Cell*, 11:223-32) y de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, I. *et al.* (1990), *Cell*, 22:817-23), que pueden emplearse en células tk<sup>-</sup> o aprt<sup>-</sup>, respectivamente. También puede emplearse la resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como base para la selección; por ejemplo, dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler, M. *et al.* (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglicósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin, F. *et al.* (1981), *J. Mol. Biol.*, 150:1-14); y als o pat, que confieren resistencia a la clorsulfurona y la fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, mencionado anteriormente). Se han descrito otros genes seleccionables, por ejemplo, trpB, que permite a las células utilizar el indol en lugar del triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar el histinol en lugar de la histidina (Hartman, S. C. y R. C. Mulligan (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:8047-51). El uso de marcadores visibles ha ganado popularidad, con marcadores tales como las antocianinas, la beta-glucuronidasa y su sustrato GUS, y la luciferasa y su sustrato luciferina, y se emplean mucho no solo para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión transitoria o estable de la proteína atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes, C. A. *et al.* (1995), *Methods Mol. Biol.*, 55:121-131).

Aunque la presencia/ausencia de la expresión de un gen de marcador sugiere que el gen de interés también está presente, es posible que su presencia y expresión deban confirmarse. Por ejemplo, si la secuencia que codifica un polipéptido se inserta dentro de una secuencia de un gen de marcador, las células recombinantes que contienen las secuencias pueden ser identificadas por la ausencia de la función del gen del marcador. Como alternativa, un gen marcador puede ser colocado en tándem con una secuencia que codifica un polipéptido bajo el control de un único promotor. La expresión del gen del marcador en respuesta a la inducción o la selección habitualmente indica la expresión del gen en tándem también.

Como alternativa, las células hospedadoras que contiene y expresan una secuencia polinucleotídica deseada pueden ser identificadas por medio de una diversidad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación hibridaciones de ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de bioensayos de proteínas o inmunoensayos que incluyen, por ejemplo, tecnologías con una base de membranas, disoluciones o chips para la detección y/o la cuantificación del ácido nucleico o la proteína.

En la técnica se conocen una diversidad de protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos empleando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Los ejemplos incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA), y la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). En algunas aplicaciones puede preferirse emplear un inmunoensayo de dos sitios basado en anticuerpos monoclonales que emplea anticuerpos monoclonales reactivos con dos epítomos no interferentes sobre un polipéptido concreto, pero también puede emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre otros textos, en Hampton, R. *et al.* (1990, *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, Minn.) y Maddox, D. E. *et al.* (1983, *J. Exp. Med.*, 158:1211-1216).

Los expertos en la técnica conocen una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación, y estos pueden utilizarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir sondas de hibridación o

de PCR marcadas para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos incluyen el oligomarcaje, la traslación por muesca, el marcate en los extremos o la amplificación con PCR empleando un nucleótido marcado. Como alternativa, las secuencias, o cualquiera de sus porciones, pueden clonarse en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Estos vectores son conocidos en la técnica, están disponibles en el mercado y pueden utilizarse para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de una ARN polimerasa apropiada, tal como T7, T3, o SP6 y nucleótidos marcados. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo empleando una diversidad de kits disponibles en el mercado. Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados que pueden utilizarse incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Las células hospedadoras transformadas con una secuencia polinucleotídica de interés pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y la recuperación de la proteína a partir del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede segregarse o quedar contenida dentro de la célula, dependiendo de la secuencia y/o el vector empleado. Tal como entenderán los expertos en la técnica, pueden diseñarse vectores de expresión que contengan los polinucleótidos de la invención para que contengan secuencias señal que dirijan la secreción del polipéptido codificado a través de la membrana de la célula procariota o eucariota. Pueden emplearse otras construcciones recombinantes para unir secuencias que codifican un polipéptido de interés a una secuencia de nucleótidos que codifique un dominio de polipéptido que facilite la purificación de las proteínas solubles. Estos dominios que facilitan la purificación incluyen, pero sin limitación, péptidos quelantes de metales, tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). Puede utilizarse la inclusión de secuencias de conectores que pueden escindirse, tales como las específicas para el factor XA o la enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, Calif.) entre el dominio de purificación y el polipéptido codificado para facilitar la purificación. Uno de estos vectores de expresión proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido de interés y un ácido nucleico que codifica 6 restos histidina que preceden a una tiorredoxina o a un sitio de escisión de enteroquinasa. Los restos histidina facilitan la purificación en una IMIAC (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados), tal como se describe en Porath, J. *et al.* (1992, Prot. Exp. Purif., 3:263-281), mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido deseado de la proteína de fusión. Se proporciona un análisis de los vectores que contienen proteínas de fusión en Kroll, D. J. *et al.* (1993, DNA Cell Biol., 12:441-453).

Además de los métodos de producción recombinantes, los polipéptidos de la invención, y sus fragmentos, pueden producirse por medio de la síntesis peptídica directa empleando técnicas en fase sólida (Merrifield J. (1963), J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154). La síntesis de proteínas puede realizarse utilizando técnicas manuales o automáticas. Puede conseguirse una síntesis automática, por ejemplo, empleando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Como alternativa, diversos fragmentos pueden sintetizarse por separado de modo químico y combinarse empleando métodos químicos para producir la molécula de longitud completa.

#### Tolerancia

La tolerancia inmunológica se define como la falta de respuesta inmunológica a un antígeno, habitualmente un antígeno implicado en provocar una enfermedad. Aunque la tolerancia puede inducirse mediante la administración de antígenos por diferentes vías, la tolerancia oral se refiere a la administración oral del antígeno, que provoca la supresión de la actividad de la enfermedad en varios modelos animales, que incluyen la encefalomiélitis autoinmunológica experimental, un modelo de roedor de la esclerosis múltiple, miastenia grave, uveítis, diabetes dependiente de insulina, y artritis inducida por colágeno (Faria y Weiner 1999). Los resultados tempranos de ensayos clínicos en seres humanos sugieren que la tolerancia oral es eficaz en la uveítis autoinmunológica, la diabetes, la alergia al níquel y, probablemente, la esclerosis múltiple (Faria y Weiner 1999; Duda *et al.*, 2000). Hay pocos estudios que indiquen la inducción de tolerancia oral en el trasplante de órganos (Sayegh *et al.*, 1996; Hancock *et al.*, 1993; Ishido *et al.*, 1999; Sayegh *et al.*, 1992a; Sayegh *et al.*, 1992b). En cada informe, se indujo tolerancia con una alimentación con péptidos derivados de MHC de donante o con una alimentación de células alogénicas antes del trasplante (Sayegh *et al.*, 1996; Hancock *et al.*, 1993; Ishido *et al.*, 1999; Sayegh *et al.*, 1992a; Sayegh *et al.*, 1992b). Estas técnicas resultaron eficaces para prevenir el rechazo de aloinjertos cardíacos y corneales (Sayegh *et al.*, 1996; Hancock *et al.*, 1993; Ishido *et al.*, 1999; Sayegh *et al.*, 1992a; Sayegh *et al.*, 1992b; Faria y Weiner, 1999). Además de disminuir la actividad de la enfermedad, la supresión inmunológica inducida por la tolerancia oral en estos estudios también se cuantificó por medio de la regulación negativa de respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) a antígenos diana, así como una disminución en la inmunidad celular y humoral (Faria y Weiner, 1999; Mayer, 2000; Garside y Mowat, 1997).

Existen tres mecanismos por medio de los cuales la tolerancia oral (y otras vías de administración) regulan negativamente las respuestas inmunológicas específicas de antígeno: 1. la supresión activa de células específicas de antígeno, 2. la anergia clonal de células específicas de antígeno, y 3. la delección clonal de células específicas de antígeno (Faria y Weiner, 1999; Miller *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995). Aunque estos tres mecanismos pueden funcionar simultáneamente en respuesta a la tolerancia oral, la supresión activa y la anergia clonal son los mecanismos clave de la supresión inmunológica inducida por la tolerancia oral (Faria y Weiner, 1999).

La supresión activa describe la regulación de un subconjunto de linfocitos por otro de una manera específica de antígeno. Dependiendo del antígeno y de la patología, las células supresoras pueden ser linfocitos T CD4+ y/o CD8+, que migran desde tejidos linfoides periféricos, tales como el bazo y los ganglios linfáticos periféricos, hasta los sitios de actividad de enfermedad. La transferencia adoptiva de estas células a receptores no expuestos ha confirmado el papel de estas células en la supresión activa en modelos de roedores de hipersensibilidad inducida por ovoalbúmina y en la esclerosis múltiple. Se demuestran pruebas *in vitro* de supresión activa por medio de datos que muestran que linfocitos tolerizados procedentes de animales pueden suprimir la proliferación de otros linfocitos T específicos de antígeno a lo largo de un sistema de cultivo de células en transwell (Faria y Weiner, 1999; Miller *et al.*, 1991).

La anergia clonal se refiere a la falta de respuesta de linfocitos T específicos de antígeno, que se caracteriza por una disminución en la proliferación después de la exposición a un antígeno, y está implicada en la tolerancia oral en varios modelos animales. La anergia puede ser el resultado de la producción de factores supresores solubles por los propios linfocitos T CD4+ o CD8+, otros linfocitos T o células en el entorno local, o como resultado de una disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras apropiadas (Faria y Weiner, 1999). La delección clonal se refiere a la eliminación de linfocitos T específicos de antígeno, pero que se ha indicado que raramente es un mecanismo de tolerancia oral frente a un antígeno (Chen *et al.*, 1995).

Los mediadores solubles que suprimen la respuesta inmunológica durante la tolerancia oral proceden principalmente de linfocitos T reguladoras o supresores (Faria y Weiner, 1999). Existen cinco tipos de linfocitos T, que se describen según las citocinas que producen: de tipo Th1 que producen interleuquina-2 (IL-2) y interferón gamma ( $\gamma$ IFN); de tipo Th2 que producen IL-4 e IL-10; de tipo Th3 que producen niveles elevados del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), solo o junto con niveles muy bajos de IL-4, IL-10 o  $\gamma$ IFN; células Tr1 que producen niveles elevados de IL-10 junto con niveles bajos de TGF- $\beta$  (Faria y Weiner *et al.*, 1999; Mayer, 2000; Garside y Mowat, 1997; Groux *et al.*, 1997); y células Th17 que producen IL-17 (véase, por ejemplo, Immunol Rev., 2008, 226:87-102; Nature, mayo de 2006, 11:441(7090):235-238). Puesto que se ha demostrado que los linfocitos T Th3, Th2 y Tr1 son los principales mediadores de la supresión activa inducida por la tolerancia oral, se cree que TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 son las citocinas clave en este proceso (Teng *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1999b). Un informe de Barone *et al.*, y otros que demuestran que se produjo inducción de la tolerancia oral en ausencia de estas citocinas sugiere que otros mediadores o células podrían suprimir la respuesta inmunológica (Barone *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1999a).

Aunque los estudios de la tolerancia oral se han centrado en las citocinas derivadas de linfocitos T que suprimen las respuestas inmunológicas, se sabe que el óxido nítrico, que no es producido por los linfocitos T, es un potente supresor de respuestas aloinmunológicas (Garside y Mowat, 1997). Estos y otros datos que demuestran que el óxido nítrico modula la apoptosis, que está implicada en la respuesta de rechazo (Meyer *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1997; Shiraishi *et al.*, 1997; Shiraishi *et al.*, 1995; Medot-Pirenne *et al.*, 1999), sugieren que el óxido nítrico podría ser un mediador de la tolerancia oral y prevenir la respuesta de rechazo. El TGF- $\beta$  es un potente inductor de la síntesis de óxido nítrico, y es un mediador clave de la supresión activa en la tolerancia oral (Faria y Weiner, 1999; Meyer *et al.*, 1998; Vodovotz *et al.*, 1998; Vodovitz *et al.*, 1999). Por tanto, la inmunosupresión inducida por TGF- $\beta$  en el hospedador tolerizado puede ser mediada, en parte, por el óxido nítrico. Sin embargo, se desconoce la producción de óxido nítrico en respuesta a la tolerancia oral.

La activación de linfocitos T específicos de antígeno inducidos por APC (células presentadoras de antígenos) requiere la interacción bidireccional entre el linfocito T y las APC. Inicialmente, las APC presentan moléculas de MHC que se unen al receptor de células T que estimula la expresión regulada positivamente del ligando CD40 (CD40L) sobre los linfocitos T. A su vez, CD40L se une a su receptor, CD40, sobre las APC. La señalización a través de CD40 induce la expresión de CD80 y CD86 sobre las APC que, tras unirse a su receptor, CD28, sobre el linfocito T, provocan la coestimulación y posterior activación del linfocito T (Liu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Lederman y Siciu-Foca, 1999). Aunque los estudios de la inducción de la tolerancia oral se han centrado en la función de los linfocitos T, un estudio reciente de Taams *et al.* (1998), ha indicado que la inducción de la tolerancia puede afectar a la función de las APC, aportando unos datos similares a los de otros investigadores (Wu *et al.*, 1998; Finkelman *et al.*, 1996; Viney *et al.*, 1998). Por ejemplo, un informe de Wu *et al.* (1998), que demuestra que la expresión de CD80 disminuye sobre las APC procedentes de los ganglios linfáticos y el bazo de ratones oralmente tolerizados, sugiere que unas APC ineficaces podrían contribuir a la activación alterada de los linfocitos T en receptores tolerizados. Además, estudios *in vitro* que demuestran que los linfocitos T supresores inhiben la expresión de CD86 en APC enfatizan otro mecanismo según el cual la tolerancia induce una función alterada de las APC (Liu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Lederman y Siciu-Foca, 1999).

La administración de col(V) evita las respuestas proliferativas frente a aloantígenos, además de prevenir las respuestas proliferativas contra sí mismo, y previene el desarrollo de una patología aguda de rechazo en pulmones receptores (véase, por ejemplo, la patente de EEUU 7.348.005; documento WO 2007/120947). Así, el col(V) puede inducir una anergia hacia los aloantígenos del donante y hacia sí mismo; o, como alternativa, la falta de respuestas proliferativas frente a antígenos de donantes y frente a colV puede deberse a la delección clonal de linfocitos de pulmón específicos de aloantígeno; o, también como alternativa, puede surgir de una actividad de células supresoras.

Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, la inducción de tolerancia por colV puede ser inducida a través de una supresión conectada (véase, por ejemplo, Hum Immunol., noviembre de 2008, 69(11):715-720). Además, se cree que puede estar implicada una unión diferencial de colV a los receptores de colágeno sobre los linfocitos, que conduce a las señales de activación diferencial (véase, por ejemplo, Cell Signal., agosto de 2006, 18(8):1108-1116). Por ejemplo, solo el colágeno V induce la señalización de IL-17 en células T.

La administración oral de antígenos es un método eficaz para inducir la tolerancia de células T periféricas. Este fenómeno, a menudo denominado tolerancia oral, se ha estudiado muy bien en diversos modelos de enfermedades autoinmunitarias en animales, incluyendo la encefalomiелitis, la uveítis, la diabetes, la miastenia grave y la artritis. Sin embargo, los mecanismos para inducir tolerancia no se entienden por completo. Todos los mecanismos conocidos para la inducción de tolerancia, incluyendo la anergia clonal, la delección clonal y la regulación por la supresión activa mediada por IL-4, IL-10 o TGF-beta, pueden desempeñar un papel en la tolerancia oral (Faria y Weiner, 1999). En general, se ha indicado que unas dosis más altas de antígeno inducen anergia o delección clonal (Chen *et al.*, 1995; Whitacre *et al.*, 1991), mientras que unas dosis bajas inducen la regulación de citocinas y la supresión activa (Faria y Weiner, 1999; Chen *et al.*, 1994). En el modelo animal de trasplante cardíaco, se ha demostrado que la administración oral de esplenocitos alogénicos es eficaz para la inducción de tolerancia, sorteando la activación de Th1 y estimulando selectivamente la inducción de citocinas inhibitorias derivadas de Th-2, tales como IL-4 (Hancock *et al.*, 1993; Ishido *et al.*, 1999).

Así, la tolerancia oral es un método para regular negativamente una respuesta inmunológica en un sujeto por medio de la administración oral de un antígeno (es decir, a través de la alimentación) al sujeto. La tolerancia oral se caracteriza por una disminución en los niveles de producción de anticuerpos sistémicos, así como una disminución de las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), proliferación de células T, respuestas citotóxicas y rechazo a injertos (Alpan *et al.*, 2001, J. Immunol., 166:4843-4852; Chen *et al.*, 1995, Nature, 376:177-180; Weiner, 1997, Imm. Today, 7:335-344; Sayegh *et al.*, 1992, Transplantation, 53:163-166).

En el presente documento también se contemplan otras vías para inducir tolerancia, en particular mediante una inyección intramuscular, subcutánea, intradérmica e intravenosa. En el presente documento se contemplan inyecciones intradérmicas, en las que unas dosis bajas tienden a inducir tolerancia y unas dosis altas inducen una respuesta inmunológica.

Los estudios de tolerancia se han centrado principalmente sobre el efecto del antígeno tolerizante sobre la función de los linfocitos T y el papel de los linfocitos T en la supresión de la activación inmunológica (Faria y Weiner, 1999; Mayer, 2000; Garside y Mowat, 1997). Sin embargo, las respuestas inmunológicas frente a cualquier antígeno requieren interacciones entre las APC y los linfocitos T, y el linfocito T puede afectar a la función de la APC (Liu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Lederman y Siciu-Foca, 1999). Por tanto, la presentación regulada negativamente del antígeno por las APC procedentes de hospedadores tolerizados puede contribuir a la inducción de tolerancia de modo indirecto, como resultado de las interacciones con los linfocitos T supresores, o probablemente como resultado de efectos directos del antígeno tolerizante sobre las APC.

Así, en ciertos aspectos de la invención, la presente invención proporciona métodos para restablecer o reforzar la autotolerancia a colV en pacientes con asma. Una realización es un método para tratar el asma mediante la administración de colV por medio de una terapia oral (Yasufuku *et al.*, 2001; Yasufuku, *et al.*, 2002) intersticialmente al pulmón o por medio de otras estrategias de desensibilización en un régimen de dosificación diseñado para aumentar la tolerancia del paciente a los colágenos que incluyen, pero no se limitan necesariamente al colV y a sus componentes antigénicos y variantes.

Un "fragmento tolerogénico" significa un fragmento que puede inducir tolerancia a la proteína de longitud completa de la cual constituye un fragmento (por ejemplo, colágeno de tipo V de longitud completa, y sus fragmentos tolerogénicos). En ciertas realizaciones, un fragmento tolerogénico puede inducir tolerancia al colágeno de tipo V de longitud completa al menos tan bien como la proteína de colágeno de tipo V de longitud completa y, en ciertas realizaciones, puede ser más eficaz que la proteína de colágeno de longitud completa para inducir tolerancia. Sin embargo, en ciertas realizaciones, un fragmento tolerogénico induce tolerancia al colágeno de tipo V de longitud completa, pero puede no inducir tolerancia con tanta eficacia como la proteína de colágeno de tipo V de longitud completa. Estos fragmentos tolerogénicos aún pueden resultar útiles en la presente invención, en particular cuando dichos fragmentos tolerogénicos presentan otras propiedades ventajosas, tales como su facilidad de preparación o purificación, comparado con la proteína de longitud completa. Tal como reconocerán los expertos en la técnica, pueden emplearse una diversidad de ensayos conocidos para evaluar la inducción de tolerancia, que incluyen medir las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), medir las producciones de citocinas mediante ELISA u otros métodos, ensayos de citotoxicidad o proliferación de células T, ensayos de proliferación de células B, producción de anticuerpos y similares. Estos ensayos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Current Protocols in Immunology, editado por John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001, John Wiley & Sons, NY, NY); Ausubel *et al.* (2001, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); patente de EEUU n.º 7.348.005; y en otras referencias bibliográficas.

Así, un fragmento tolerogénico es un fragmento de un polipéptido tolerogénico, tal como el colágeno de tipo V, o una cualquiera o más de sus cadenas alfa, que, en sí mismo, sea inmunológicamente tolerogénico (es decir, induce tolerancia) con respecto a las células B y/o células T específicas que reconocen el polipéptido a través de los receptores en su superficie (por ejemplo, receptor de anticuerpos de células B o receptor de células T). En general, los fragmentos tolerogénicos pueden identificarse empleando técnicas muy conocidas, tales como las que se resumen en Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª ed., (Raven Press, 1993) y las referencias citadas en dicho documento. Estas técnicas incluyen seleccionar polipéptidos por su capacidad para reducir la reactividad de células T y/o células B. Tal como se emplean en el presente documento, los antisueros y los anticuerpos son "específicos de antígeno" si se unen específicamente a un antígeno (es decir, reaccionan específicamente con la proteína en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo, y no reaccionan de modo detectable con proteínas no relacionadas). Dichos antisueros y anticuerpos pueden prepararse como se describe en el presente documento y empleando técnicas muy conocidas.

En una realización, un fragmento tolerogénico de un polipéptido de la presente invención es una porción que induce tolerancia de células B y/o células T a un nivel que no es sustancialmente menor que la actividad tolerogénica del polipéptido de longitud completa (por ejemplo, en un ensayo apropiado, tal como de producción de anticuerpos, que puede medirse con ELISA y/o un ensayo de reactividad de células T (ensayo de proliferación de células T o de producción de citocinas)). Preferiblemente, el nivel de actividad tolerogénica de la porción tolerogénica es al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o mayor que aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la actividad tolerogénica del polipéptido de longitud completa. En algunos casos, se identificarán fragmentos tolerogénicos que presenten un nivel de actividad tolerogénica mayor que el del correspondiente polipéptido de longitud completa, por ejemplo, tendrán más de aproximadamente 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o 150 % o más de actividad tolerogénica.

En ciertas realizaciones, los fragmentos tolerogénicos pueden identificarse empleando un análisis por ordenador, tal como el programa Tsites (véase Rothbard y Taylor, *EMBO J.*, 7:93-100, 1988; Deavin *et al.*, *Mol. Immunol.*, 33:145-155, 1996), que busca motivos peptídicos que tengan el potencial de suscitar respuestas Th. Pueden identificarse los péptidos de CTL con motivos apropiados para la unión a MHC de clase I o de clase II murino y humano según BIMAS (Parker *et al.*, *J. Immunol.*, 152:163, 1994) y otros análisis de predicción de la unión de péptidos HLA. Como alternativa, pueden identificarse las porciones que se unen a una molécula de MHC concreta empleando motivos de unión peptídicos definidos, tales como los descritos en Rammensee *et al.*, *Immunogenetics*, 41:178-228, 1995. Para confirmar la unión del péptido a las moléculas de MHC de clase I o de clase II murinas y humanas, pueden emplearse ensayos de unión de péptidos conocidos en la técnica. Para confirmar la inmunogenicidad o la tolerogenicidad, un péptido puede ensayarse empleando un HLA A2 u otro modelo de ratón transgénico y/o un ensayo de estimulación *in vitro* empleando células dendríticas, fibroblastos o células de sangre periférica.

Debe advertirse que, en ciertas realizaciones, un fragmento tolerogénico de la invención también es un fragmento inmunogénico. A este respecto, tal como reconocerán los expertos en la técnica, los fragmentos altamente inmunogénicos, tales como los epítomos inmunodominantes de proteínas tales como colV, pueden ser tolerogénicos cuando se administran correctamente, por ejemplo, en general a dosis bajas durante un periodo largo de tiempo. Así, la presente invención también contempla la identificación y el uso de fragmentos inmunogénicos de colV, en los que dichos fragmentos inmunogénicos pueden utilizarse para inducir tolerancia. A este respecto, el nivel de actividad inmunogénica de una porción inmunogénica es de al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o mayor que aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la actividad inmunogénica del polipéptido de longitud completa. En algunos casos, se identificarán fragmentos inmunogénicos que presenten un nivel de actividad inmunogénica mayor que el del correspondiente polipéptido de longitud completa, por ejemplo, tendrán más de aproximadamente 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o 150 % o más de actividad inmunogénica.

Los mismos análisis pueden emplearse para identificar fragmentos inmunogénicos que se emplean para identificar fragmentos tolerogénicos, que incluyen el empleo de un análisis con ordenador, tal como el programa Tsites (véase Rothbard y Taylor, *EMBO J.*, 7:93-100, 1988; Deavin *et al.*, *Mol. Immunol.*, 33:145-155, 1996), que busca motivos peptídicos que tengan el potencial de suscitar respuestas Th. Pueden identificarse los péptidos de CTL con motivos apropiados para la unión a MHC de clase I o de clase II murino y humano según BIMAS (Parker *et al.*, *J. Immunol.*, 152:163, 1994) y otros análisis de predicción de la unión de péptidos HLA. Como alternativa, pueden identificarse las porciones que se unen a una molécula de MHC concreta empleando motivos de unión peptídicos definidos, tales como los descritos en Rammensee *et al.*, *Immunogenetics* 41:178-228, 1995. Para confirmar la unión del péptido a las moléculas de MHC de clase I o de clase II murinas y humanas, pueden emplearse ensayos de unión a péptidos conocidos en la técnica. Para confirmar la inmunogenicidad o la tolerogenicidad, un péptido puede ensayarse empleando un HLA A2 u otro modelo de ratón transgénico y/o un ensayo de estimulación *in vitro* empleando células dendríticas, fibroblastos o células de sangre periférica.

El colágeno de tipo V intacto o uno cualquiera o más de sus componentes de cadenas alfa que tengan actividad tolerogénica o inmunogénica se contemplan para su uso en los métodos de la presente invención. Como tales, un fragmento tolerogénico o un fragmento inmunogénico del colágeno V pueden indicar un fragmento del colágeno de tipo V intacto o pueden indicar un fragmento tolerogénico o inmunogénico de uno cualquiera de los componentes de

5 cadenas alfa. En ciertas realizaciones, el colV, tal como se emplea en el presente documento, puede comprender la molécula de colágeno compuesta de las tres cadenas alfa. En otra realización, el colV puede comprender una cualquiera o más de las cadenas alfa, tales como las indicadas en SEQ ID NO:2, 4 o 6, codificadas por los polinucleótidos indicados en SEQ ID NO:1, 3 o 5, o uno de sus fragmentos tolerogénicos o fragmentos inmunogénicos.

10 En ciertas realizaciones, dos o más fragmentos tolerogénicos o inmunogénicos pueden emplearse al mismo tiempo, administrados por separado, mezclados en una composición o como una proteína de fusión. A este respecto, puede emplearse cualquier número de fragmentos tolerogénicos o fragmentos inmunogénicos para inducir una tolerancia al colV, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más fragmentos tolerogénicos o inmunogénicos, en una composición como fragmentos separados o como una proteína de fusión, con o sin conectores. En ciertas realizaciones, pueden emplearse 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más fragmentos en los métodos de la presente invención.

15 La detección de la presencia de anticuerpos contra el colágeno según algunas realizaciones puede realizarse empleando cualquiera de una serie de procedimientos de inmunoensayo, tal como por medio de procedimientos de ELISA. Están disponibles una amplia gama de técnicas de inmunoensayo, tal como se observa remitiéndose a los manuales de inmunoensayos convencionales y estas incluyen, pero sin limitación ensayos de sitio único y de dos sitios o de "sándwich" de tipo no competitivo, así como los ensayos de unión competitiva tradicionales.

20 Los ensayos de "sándwich" se encuentran entre los métodos de ensayos basados en anticuerpos más útiles y habitualmente empleados y pueden utilizarse para llevar a cabo diversas realizaciones. Existen una serie de variaciones de la técnica del ensayo de "sándwich" y se pretende que todas se incluyan en diversas realizaciones. Brevemente, en un ensayo típico para detectar anticuerpos en una muestra, un antígeno no marcado se inmoviliza sobre un sustrato sólido y la muestra que se va a ensayar se pone en contacto con la molécula de antígeno unida. Después de un periodo de incubación adecuado, es decir, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno, se añade un segundo anticuerpo, tal como una anti-IgG humana, marcado con una molécula indicadora capaz de producir una señal detectable, y se incuba, dejando que pase el tiempo suficiente para que se forme un anticuerpo marcado con el anticuerpo-antígeno. Cualquier material sin reacción se lava y se determina la presencia del anticuerpo que se va a detectar en la muestra por medio de la observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por ejemplo, por la simple observación de la señal visible, o pueden cuantificarse comparando la señal generada por una muestra de interés con una muestra control que contenga cantidades conocidas del anticuerpo que se va a detectar. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al antígeno unido. Estas técnicas son muy conocidas, incluyendo cualquier pequeña variación, tal como será evidente para los expertos en la técnica. En el ensayo de "sándwich" típico, el antígeno se inmoviliza, por ejemplo, uniéndose de modo covalente o de modo pasivo a una superficie sólida. En algunas realizaciones, la superficie sólida generalmente es vidrio o un polímero, y los polímeros que se emplean más habitualmente son celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. En la técnica se conocen diversos procesos de unión y estos consisten, en general, en la reticulación, la unión covalente o la adsorción física del antígeno a una superficie concreta. El antígeno inmovilizado después se lava en preparación para la adición de la muestra de ensayo. Después se pone en contacto una alícuota de la muestra que se va a ensayar con el antígeno inmovilizado y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-40 minutos) y en condiciones adecuadas (por ejemplo, 25 °C) para permitir la unión de cualquier anticuerpo al colágeno presente en la muestra. La duración real del tiempo de contacto, las condiciones de tampón, las temperaturas y similares son parámetros que pueden ajustarse con facilidad y generalmente se determinan con facilidad en un ensayo concreto. Después del periodo de incubación, el antígeno inmovilizado que incluya cualquier anticuerpo unido se lava y se seca, y se incuba con un segundo anticuerpo específico para el anticuerpo unido, por ejemplo, anti-IgG humana. El segundo anticuerpo se une a una molécula indicadora, que se emplea para indicar la unión del segundo anticuerpo al complejo de anticuerpo-antígeno inmovilizado.

55 Un método concreto para medir anticuerpos contra colV se describe en el documento WO 2007/120947. De modo específico, este ensayo de perlas detecta anticuerpos contra el colágeno de tipo V, tal como pueden estar presentes en suero y/o fluido de lavado pulmonar procedente de pacientes que presentan una respuesta autoinmunitaria al colágeno de tipo V. Las perlas revestidas con colágeno de tipo V, junto con otros reactivos necesarios, se proporcionan para este ensayo. Brevemente, un ensayo típico es el siguiente: 1) Perlas revestidas con estreptavidina (por ejemplo, tales como las de Polyscience, Warrington, PA) se lavan con PBS estéril. Las perlas se suspenden en un volumen apropiado de PBS con colágeno de tipo V humano. 2) Se genera un control positivo siguiendo el mismo procedimiento de 1 anterior, empleando anticuerpo de conejo contra anticuerpos de colágeno V humano (Bioten) (Abeam, Cambridge, MA). 3) Para cada ensayo, las perlas conjugadas se lavan en PBS, y se incuban en PBS más suero de fluido de lavado pulmonar. Las perlas después se lavan con PBS que contiene FCS al 10 %. 4) Las perlas después se suspenden en PBS + FBS al 10 % estéril y se incuban a temperatura ambiente con anticuerpo secundario. Generalmente, se emplea un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con R-PE (Sigma, Saint Louis), aunque los expertos en la técnica entenderán que están disponibles otros anticuerpos adecuados. A este respecto, pueden emplearse anticuerpos específicos anti-IgG1, -IgG2, -IgG3 o -IgG4 humanas en ciertas

realizaciones para detectar el cambio de un subtipo a otro durante el desarrollo de una enfermedad. Las perlas se lavan con PBS que contiene FCS al 10 %, se suspenden en una disolución de PBS/FCS y se analizan empleando un citómetro de flujo. Para el control positivo, pueden añadirse cantidades conocidas de anticuerpo o antisuero anti-colV al ensayo de perlas.

5  
10  
15  
20  
Generalmente, los anticuerpos contra colV que se encuentran en pacientes con EPOC y asma son IgG, pero también pueden estar presentes otras clases de anticuerpos, tales como IgM. Además, en ciertas realizaciones de la presente invención, el subtipo de anticuerpos de IgG contra el colágeno de tipo V, tal como pueden estar presentes en suero y/o fluido de lavado pulmonar procedente de los pacientes, cambia a lo largo del desarrollo de la enfermedad. A este respecto, el cambio de subtipo de IgG puede producirse durante el desarrollo de la enfermedad y ciertos subtipos pueden ser indicativos de un empeoramiento de la enfermedad. Así, uno cualquiera o más de los subtipos de IgG pueden estar presentes durante el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o cualquiera de sus combinaciones. La presente invención proporciona métodos para detectar anticuerpos de los subtipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 específicos del colágeno de tipo V, empleando el ensayo de perlas según se describe en el presente documento. Tal como reconocerán los expertos en la técnica, los anticuerpos específicos del subtipo de IgG están disponibles en el mercado y pueden emplearse en los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, un aumento en IgG1 indica el empeoramiento de la enfermedad. En otra realización, un cambio al subtipo IgG2 indica el empeoramiento de la enfermedad. En otra realización, un cambio al subtipo IgG3 indica el empeoramiento de la enfermedad. En otra realización, un cambio al subtipo IgG4 indica el empeoramiento de la enfermedad.

#### Composiciones, composiciones farmacéuticas y métodos de uso

25  
30  
35  
La administración de las composiciones o los compuestos tolerogénicos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, puede realizarse por medio cualquiera de las vías de administración de agentes aceptadas que sirven en utilidades similares. Tal como se ha indicado en otro punto en el presente documento, una vía contemplada en el presente documento para inducir tolerancia es la administración oral. Sin embargo, también puede utilizarse cualquiera de una diversidad de otras vías, que incluyen, en particular, la inyección intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea y otras vías. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse combinando un compuesto de la invención con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado, y pueden formularse en preparaciones en forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, disoluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Además, dentro de la composición pueden estar presentes, aunque no es necesario, otros ingredientes farmacéuticamente aceptables (incluyendo otros agentes inmunosupresores) y/o excipiente adecuados, tales como sales, tampones y estabilizantes.

40  
La administración también puede realizarse por medio de una diversidad de vías diferentes, que incluyen la vía oral, parenteral, nasal, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica. Las vías de administración preferidas dependen de la naturaleza del trastorno que se va a tratar o prevenir. Una cantidad que, después de su administración, reduce, inhibe, previene o retarda la aparición de una respuesta inmunológica anti-colV o una indicación clínica de dicha respuesta se considera eficaz.

45  
50  
55  
En ciertas realizaciones, la cantidad administrada es suficiente para producir una reducción en la actividad inmunológica, tal como se describe en otro punto en el presente documento (por ejemplo, una respuesta de células T, una respuesta de células B, el nivel de anticuerpos anti-colV y similares). La dosificación y la duración precisas del tratamiento es una función de la enfermedad que se está tratando y pueden ser determinadas de modo empírico empleando protocolos de ensayo o ensayando las composiciones en sistemas de modelos conocidos en la técnica y extrapolando desde estos. También pueden realizarse ensayos clínicos controlados. Las dosificaciones también pueden variar según la gravedad del trastorno que se va a aliviar. Una composición farmacéutica en general se formula y se administra para que ejerza un efecto terapéuticamente útil, al mismo tiempo que se minimizan los efectos secundarios indeseables. La composición puede administrarse de una vez, o puede dividirse en una serie de dosis más pequeñas para ser administradas en intervalos de tiempo. Para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos pueden ajustarse a lo largo del tiempo según las necesidades individuales.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos conocidos, tales como regímenes inmunosupresores, terapia de radiación, quimioterapia, trasplante, terapia oral de colágeno, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc.

60  
65  
Por tanto, las vías típicas para la administración de estas y otras composiciones farmacéuticas relacionadas incluyen, sin limitación, la vía oral, tópica, transdérmica, por inhalación, instilación intrapulmonar, parenteral, sublingual, bucal, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral, tal como se emplea en el presente documento, incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraesternales o técnicas de infusión. Las composiciones de la invención se formulan para permitir que los principios activos contenidos en su interior puedan estar biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un sujeto o paciente tomarán la forma de una o más unidades de dosificación, en las que, por ejemplo, un

comprimido puede ser una única dosificación unitaria, y un recipiente de un compuesto de la invención en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación. Se conocen métodos reales de preparación de dichas formas de dosificación, o serán evidentes para los expertos en la técnica; por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición que se va a administrar contendrá, en cualquier caso, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de una enfermedad o una afección de interés según las indicaciones de esta invención.

Una composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un sólido o un líquido. En un aspecto, el vehículo o vehículos están en partículas, de modo que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimidos o de polvos. El vehículo o vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un aceite oral, un líquido inyectable o un aerosol, que es útil, por ejemplo, para la administración por inhalación.

En ciertas realizaciones, el compuesto o compuestos terapéuticos se administran directamente como una formulación en aerosol presurizado o nebulizada a los pulmones del paciente por inhalación. Estas formulaciones pueden contener cualquiera de una diversidad de propulsores de aerosol conocidos útiles para la administración por inhalación endopulmonar y/o intranasal. Además, puede estar presente agua, con o sin cualquiera de una diversidad de codisolventes, tensioactivos, estabilizantes (por ejemplo, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y tampones). Para las composiciones que se van a administrar a partir de múltiples recipientes de dosis, generalmente se añaden agentes antimicrobianos. Estas composiciones, en general, también se filtran y se esterilizan, y pueden liofilizarse para proporcionar una estabilidad potenciada y para mejorar la solubilidad.

Cuando está prevista para la administración oral, la composición farmacéutica está preferiblemente en forma sólida o líquida, en la que formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y en gel se incluyen dentro de las formas consideradas en el presente documento sólidas o líquidas.

Como composición sólida para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse como un polvo, gránulos, comprimidos prensados, píldoras, cápsulas, goma de mascar, obleas o formas similares. Dicha composición sólida generalmente contendrá uno o más diluyentes inertes o vehículos comestibles. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; excipientes, tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes, tales como ácido alginico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes, tales como estearato de magnesio o Sterotex; emolientes, tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja; y una agente colorante.

Cuando la composición farmacéutica está en forma de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como polietilenglicol o aceite.

La composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, disolución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para la administración oral o para el suministro por medio de inyección, como dos ejemplos. Cuando esté prevista para la administración oral, la composición preferida contendrá, además de los presentes compuestos, uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del sabor. En una composición prevista para ser administrada mediante inyección, pueden incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente suspensor, tampón, estabilizante y agente isotónico.

Las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención, tanto si son disoluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles, tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles, tales como mono- o diglicéridos sintéticos que pueden actuar como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede introducirse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

Una composición farmacéutica líquida de la invención prevista para la administración parenteral u oral debe contener una cantidad de un compuesto de la invención de modo que se obtenga una dosificación adecuada. Generalmente, esta cantidad es al menos 0,01 % de un compuesto de la invención en la composición. Cuando está prevista para la administración oral, esta cantidad puede variar entre 0,1 y aproximadamente 70 % del peso de la composición. Ciertas composiciones farmacéuticas orales contienen entre aproximadamente 4 % y aproximadamente 75 % del compuesto de la invención. Ciertas preparaciones y composiciones farmacéuticas según la presente invención se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga entre 0,01 y 10 % en peso del compuesto antes de la dilución de la invención.

- 5 La composición farmacéutica de la invención puede estar prevista para la administración tópica, en cuyo caso, el vehículo puede comprender, de modo adecuado, una disolución, una emulsión, un ungüento o una base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes, tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizantes. Pueden estar presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica para la administración tópica. Si está prevista para la administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden contener una concentración del compuesto de la invención desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 % en p/v (peso por unidad de volumen).
- 10 La composición farmacéutica de la invención puede estar prevista para la administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio, que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para la administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Estas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.
- 15 La composición farmacéutica de la invención puede incluir diversos materiales, que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que formen una cubierta de revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la cubierta de revestimiento generalmente son inertes y pueden seleccionarse, por ejemplo, de azúcar, goma laca y otros agentes de revestimiento entérico. Como alternativa, los principios activos pueden estar recluidos en una cápsula de gelatina.
- 20 La composición farmacéutica de la invención en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se une al compuesto de la invención y, con ello, ayuda al transporte del compuesto. Los agentes adecuados que pueden actuar en esta capacidad incluyen un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína o un liposoma.
- 25 La composición farmacéutica de la invención puede consistir en unidades de dosificación que pueden administrarse como un aerosol. El término aerosol se emplea para indicar una diversidad de sistemas que varían de los sistemas de naturaleza coloidal a los sistemas que consisten en envases presurizados. La administración puede realizarse por medio de un gas licuado o comprimido, o por medio de un sistema de bomba adecuado que dispense los principios activos. Los aerosoles de los compuestos de la invención pueden administrarse en sistemas de una sola fase, bifásicos o trifásicos para administrar el principio o principios activos. La administración del aerosol incluye el recipiente, activador, válvula, subrecipiente y similares necesarios, que juntos pueden formar un kit. Los expertos en la técnica pueden determinar, sin experimentación innecesaria, los aerosoles preferidos.
- 30 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante metodologías muy conocidas en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica prevista para ser administrada mediante inyección puede prepararse combinando un compuesto de la invención con agua estéril destilada para formar una disolución. Puede añadirse un tensioactivo para facilitar la formación de una suspensión o una disolución homogénea. Los tensioactivos son compuestos que interaccionan de modo no covalente con el compuesto de la invención para facilitar la disolución o la suspensión homogénea del compuesto en el sistema de administración acuoso.
- 35 Los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptable, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará dependiendo de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado; la estabilidad metabólica y longitud de acción del compuesto; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; la vía y el momento de la administración; la velocidad de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la afección concretos; y el sujeto que se está sometiendo a terapia. En general, una dosis diaria terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 0,001 mg/kg (es decir, 0,07 mg) a aproximadamente 100 mg/kg (es decir, 7,0 g); preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 0,01 mg/kg (es decir, 0,7 mg) a aproximadamente 50 mg/kg (es decir, 3,5 g); más preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 1 mg/kg (es decir, 70 mg) a aproximadamente 25 mg/kg (es decir, 1,75 g).
- 40 En ciertas realizaciones, la dosis de colV administrada por vía oral es desde 0,001 mg a 500 mg diarios. En una realización concreta, la dosis oral de colV, tal como se describe en el presente documento, es de 0,01 mg a 50 mg diarios. En otra realización, la dosis oral de colV, tal como se describe en el presente documento, es de 0,1 mg a 0,5 mg diarios. En una realización, la dosis oral de colV es de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, o 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 o 5,0 mg diarios. En otra realización, la dosis oral de colV puede ser de 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 o 8,0 mg diarios. En ciertas realizaciones, la dosis puede administrarse en una única dosis o puede administrarse en múltiples dosis a lo largo del día, por ejemplo, en 2, 3 o 4 dosis diarias para un total de una dosis en mg/día concreta.
- 45 Tal como se describe en otro punto en el presente documento, en ciertas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz de colV, tal como se emplea en el presente documento, es una dosis suficiente para inducir tolerancia a colV medida según cualquiera de una diversidad de métodos, tal como se describe en el presente documento. En ciertas
- 50
- 55
- 60
- 65

realizaciones, la inducción de tolerancia a colV provoca una disminución en los anticuerpos anti-colV séricos, según se mide empleando los métodos descritos en el presente documento, tales como un ELISA. En otra realización, una dosis terapéuticamente eficaz de colV, tal como se emplea en el presente documento, es una dosis suficiente para inducir tolerancia en células T a colV medida según cualquiera de una diversidad de métodos, tal como se describe en el presente documento, tales como ensayos de liberación de citocinas, tinción de citocinas intracelulares y citometría de flujo, ELISPOT, y similares. También pueden emplearse ensayos de células T funcionales, tales como ensayos de proliferación de citotoxicidad.

Los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, también pueden administrarse simultáneamente, antes o después de la administración de uno o más agentes terapéuticos diferentes. Dicha terapia de combinación incluye la administración de una única formulación de dosificación farmacéutica que contiene un compuesto de la invención y uno o más agentes activos adicionales, así como la administración del compuesto de la invención y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica separada. Por ejemplo, un compuesto de la invención y otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una única composición de dosificación oral, tal como un comprimido o una cápsula, o cada agente se administra en formulaciones de dosificación oral separadas. Cuando se emplean formulaciones de dosificación separadas, los compuestos de la invención y uno o más agentes activos adicionales pueden administrarse fundamentalmente al mismo tiempo, es decir, simultáneamente, o en diferentes momentos escalonados, es decir, secuencialmente; se entiende que la terapia de combinación incluye todos estos regímenes.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse a un individuo que padece una enfermedad o trastorno, según se describe en el presente documento, tal como asma grave y persistente. Para el uso *in vivo* para el tratamiento de una enfermedad humana, los compuestos descritos en el presente documento en general se incorporan en una composición farmacéutica antes de la administración. Una composición farmacéutica comprende uno o más de los compuestos descritos en el presente documento, en combinación con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable, tal como se describió en otro punto en el presente documento. Para preparar una composición farmacéutica, una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos se mezcla con cualquier vehículo o vehículos o excipiente farmacéutico conocidos por los expertos en la técnica por ser adecuados para la vía de administración concreta. Un vehículo farmacéutico puede ser líquido, semilíquido o sólido. Las disoluciones o suspensiones empleadas para la aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir, por ejemplo, un diluyente estéril (tal como agua), solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otro disolvente sintético; agentes antibacterianos (tales como alcohol bencílico o metilparabenos); antioxidantes (tales como ácido ascórbico y bisulfito de sodio) y agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); tampones (tales como acetatos, citratos y fosfatos). Si se administran por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS), y disoluciones que contengan agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol y sus mezclas.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse con vehículos que los protejan contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como revestimientos o formulaciones de liberación a lo largo del tiempo. Estos vehículos incluyen formulaciones de liberación controlada, tales como, pero sin limitarse a implantes y sistemas de administración microencapsulados, y polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), polioortésteres, poli(ácido láctico) y otros conocidos por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, los adyuvantes que ayuden a inducir tolerancia incluyen dexametasona (véase, por ejemplo, Y. Kang, *et al.*, J. Immunol., 2008, 180:5172-5176), lipopolisacáridos (LPS) y la subunidad  $\beta$  de la toxina del cólera, y pueden añadirse a las formulaciones. También se contemplan ciertos otros vehículos tolerogénicos para su uso con la composición de colV de la presente invención. Estos vehículos incluyen vehículos de aceites minerales, tales como adyuvante de Freund incompleto (IFA) o adyuvante de Freund completo (CFA). El IFA es una emulsión de un aceite mineral. El CFA es una preparación de un aceite mineral que contiene diversas cantidades de organismos muertos de micobacterias. Sin embargo, IFA y CFA no están permitidos para un uso en seres humanos, porque el aceite mineral no es metabolizable y no puede ser degradado por el cuerpo.

En ciertas realizaciones, las emulsiones de grasas, que se han empleado durante muchos años para nutrición intravenosa de pacientes humanos, también pueden actuar como vehículo para la terapia de polipéptidos tolerogénicos que emplea los polipéptidos de la presente invención. Dos ejemplos de dichas emulsiones son las emulsiones de grasas disponibles en el mercado conocidas como Intralipid y Lipofundin. "Intralipid" es una marca registrada de Kabi Pharmacia, Suecia, para una emulsión de grasas para la nutrición intravenosa, descrita en la patente de EEUU n.º 3.169.094. "Lipofundin" es una marca registrada de B. Braun Melsungen, Alemania. Ambos contienen aceite de soja como grasa (100 o 200 g en 1.000 ml de agua destilada: al 10 % o al 20 %, respectivamente). Se emplean fosfolípidos de yema de huevo como emulsionantes en Intralipid (12 g/l de agua destilada) y lecitina de yema de huevo en Lipofundin (12 g/l de agua destilada). La isotonicidad se logra añadiendo glicerol (25 g/l) en Intralipid y en Lipofundin. Se cree que estos vehículos son realmente vehículos biológicamente activos que, cuando forman complejos con el autoantígeno sospechoso, estimulan un cambio de TH1 a TH2 de las células T autoinmunitarias. En ciertas realizaciones, este vehículo es una emulsión de grasas que comprende 10-

20 % de triglicéridos de origen vegetal y/o animal, 1,2-2,4 % de fosfolípidos de origen vegetal y/o animal, 2,25-4,5 % de osmorregulador, 0-0,05 % de antioxidante, y agua estéril hasta 100 %.

5 En ciertas realizaciones, el colV, o sus fragmentos tolerogénicos, pueden estar unidos al receptor de la toxina de la difteria para potenciar la captación GI.

Las composiciones tolerogénicas de la presente invención pueden emplearse para tratar el asma.

10 En una realización, la invención proporciona un método para tratar el asma, que comprende administrar a un paciente con asma una cantidad terapéuticamente eficaz de colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos tolerogénicos, o uno de sus fragmentos inmunogénicos, que se administra en una dosis eficaz para inducir tolerancia. A este respecto, el paciente con asma puede presentar asma grave y persistente. En otra realización, la presente invención proporciona métodos para reducir la gravedad del asma en un paciente con asma.

15 Tal como se ha indicado en otro punto en el presente documento, puede administrarse el colV intacto, o uno cualquiera o más de sus componentes de cadenas  $\alpha$ , o un fragmento tolerogénico de cualquiera de las moléculas mencionadas. Además, tal como se ha indicado en otro punto en el presente documento, puede administrarse un fragmento inmunogénico del colV intacto, o uno cualquiera o más de sus componentes de cadenas  $\alpha$ , en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, empleando una dosis eficaz para inducir tolerancia a colV. Esta  
20 dosis variará dependiendo de una diversidad de factores, que incluyen la actividad de las proteínas o fragmentos específicos empleados; la estabilidad metabólica y longitud de acción de estos compuestos; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; la vía y el momento de la administración; la velocidad de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la afección concretos; y el sujeto que se está sometiendo a terapia. Así, estas dosis tolerogénicas pueden determinarse de modo empírico empleando protocolos  
25 de ensayo conocidos o ensayando las composiciones en sistemas de modelos conocidos en la técnica y extrapolando desde estos. También pueden realizarse ensayos clínicos controlados. Las dosificaciones también pueden variar según la gravedad del trastorno que se va a aliviar.

30 Tal como apreciarán con facilidad los expertos en la técnica, pueden evaluarse una diversidad de factores para determinar la eficacia de los compuestos y los métodos de la invención para tratar, prevenir o reducir la gravedad del asma. Estos factores incluyen los síntomas clínicos típicos del asma, que pueden ser evaluados por los médicos expertos. Estos síntomas pueden incluir, pero sin limitación los siguientes: para el asma: respiración sibilante; tensión o dolor en el pecho; frecuencia cardíaca rápida; sudoración; tasas de flujo máximo, medidas con un medidor del flujo máximo; tos frecuente, en especial durante la noche; falta de aliento con facilidad o apnea; sensación de  
35 mucho cansancio o debilidad al hacer ejercicio; respiración sibilante o tos después del ejercicio; sensación de cansancio, se enfada con facilidad, tiene mal humor o tiene un carácter temperamental; disminución o cambios en la función pulmonar, medida con un medidor del flujo máximo; síntomas de resfriado o alergias (estornudos, rinorrea, tos, congestión nasal, dolor de garganta y cefalea); dificultades para dormir. Las composiciones y los métodos de la presente invención pueden emplearse junto con otros tratamientos conocidos para el asma, tales como, pero sin limitarse a corticosteroides (por ejemplo, prednisona, fluticasona, metilprednisolona), broncodilatadores (por ejemplo, agonistas de  $\beta_2$  de acción a corto y a largo plazo, teofilina, pirbuterol, efedrina, albuterol, salmeterol, levalbuterol, clenbuterol, bromuro de ipratropio), y modificadores de leucotrienos (por ejemplo, montelukast, zafirlukast, zileutona).

#### 45 Referencias bibliográficas

Se mencionan específicamente las siguientes referencias bibliográficas, en la medida en que proporcionan ejemplos de procedimientos u otros detalles complementarios a los indicados en el presente documento. Chen, Inobe, Marks, Gonnella, Kuchroo, Weiner, "Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance," *Nature*, 376:177-180,  
50 1995. Chen, Kuchroo, Inobe, Hafler, Weiner, "Regulatory T-cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis," *Science*, 265:1237-1240, 1994. Chiang, Mainardi, Seyer, "Type V(A-B) collagen induces platelet aggregation," *J. Lab. Clin. Med.*, 95:99-107, 1980. Cremer, Ye, Terato, Owens, Seyer, Kang, "Type XI collagen-induced arthritis in the Lewis rat: characterization of cellular and humoral immune responses to native types XI, V, and II collagen and constituent  $\alpha$ -chains," *J. Immunol.* 153:824-832, 1994. Danzer, Kirchner, Rink, "Cytokine interactions in human mixed lymphocyte culture," *Transplantation*, 57(11):1638-1642, 1994. DeMeester, Rolfe, Kunkel, Swiderski, Lincoln, Deeb, Strieter, "The bimodal expression of tumor necrosis factor-  $\alpha$  in association with rat lung reimplantation and allograft rejection," *J. Immunol.*, 150(6):2494-2505, 1993. Faria y Weiner, "Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications," *Adv. Immunol.*, 73:153-264, 1999. Fedoseyeva, Zhang, Orr, Levin, Buncke, Benichou, "De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process," *J. Immunol.*, 162:6836-42, 1999. Garroville, Ali, Oluwole, "Indirect allorecognition in acquired thymic tolerance: induction of donor-specific tolerance to rat cardiac allografts by allopeptide-pulsed host dendritic cells," *Transplantation*, 68:1827-1834, 1999. Hancock, Sayegh, Kwok, Weiner, Carpenter, "Oral, but not intravenous, alloantigen prevents accelerated allograft rejection by selective intragraft Th2 cell activation," *Transplantation*, 55:1112-1118, 1993. Hanson, Gorman, Oui, Cheah, Solomon, Trowsdale, "The human  $\alpha$  2(XI) collagen gene (COL11A2) maps to the centromeric of the major histocompatibility complex on chromosome 6," *Genomics*, 5:925-931, 1989. Hirt, You, Moller, Boeke, Starke, Spranger, Wottge, "Development of obliterative bronchiolitis after

allogeneic rat lung transplantation: Implication of acute rejection and the time point of treatment," *J. Heart Lung Transplant.*, 18:542-548, 1999. Huang, Fuchimoto, Scheier-Dolberg, Murphy, Neville, Sachs, *J. Clin. Invest.*, 105:173-181, 2000. Ishido, Matsuoka, Matsuno, Nakagawa, Tanaka, "Induction of donor-specific hyporesponsiveness and prolongation of cardiac allograft survival by jejunal administration of donor splenocytes," *Transplantation*, 68:1377-1382, 1999. Iyer, Woo, Cornejo, Gao, McCoubrey, Maines, Buelow, "Characterization and biologic significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84(E  $\alpha$  V) binding protein," *J. Bio. Chem.*, 273(5):2692-2697, 1998. Joo, Pepose, Stuart, "T-cell mediated responses in a murine model of orthotopic corneal transplantation," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36:1530-1540, 1995. Konomi, Hayashi, Nakayasu, Arima, "Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin," *Am. J. Pathol.*, 116:417-426, 1984. Krensky y Clayberger, "HLA-derived peptides as novel immunosuppressives," *Nephrol. Dial. Transplant.*, 12:865-878, 1997. Lowry, Marghesco, Blackburn, "Immune mechanisms in organ allograft rejection. VI. Delayed-type hypersensitivity and lymphotoxin in experimental renal allograft rejection," *Transplantation.*, 40:183-188, 1985. Madri y Furthmayr, "Collagen polymorphism in the lung," *Human Pathology*, 11:353-366, 1980. Madri y Furthmayr, "Isolation and tissue localization of type AB2 collagen from normal lung parenchyma," *Am. J. Pathol.*, 94:323-332, 1979. Marck, Prop, Widevuur, "Lung transplantation in the rat. III. Functional studies in iso- and allografts," *J. Surgical Res.*, 35:149-158, 1983. Matsumura, Marchevsky, Zuo, Kass, Matloff, Jordan, "Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation," *Transplantation.*, 59:1509-1517, 1995. Morris y Bachinger, "Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (1  $\alpha$ , 2  $\alpha$ , 3  $\alpha$ ) retaining non-triple helical domains. *J. Biological Chem.*, 262:11345-11350, 1987. Murphy, Magee, Alexander, Waaga, Snoeck, Vella, Carpenter, Sayagh, "Inhibition of allorecognition by a human class II MHC-derived peptide through the induction of apoptosis," *J. Clin. Invest.*, 103:859-867, 1999. Nosner, Goldberg, Naftzger, Lyu, Clayberger, Krensky, "HLA-derived peptides which inhibit T cell function bind to members of the heat-shock protein 70 family," *J. Exp. Med.*, 183:339-348, 1996. Oluwole, Chowdhury, Jin, Hardy, "Induction of transplantation intolerance to rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of allogeneic soluble peptides," *Transplantation*, 56(6):1523-1527, 1993. Prop, Nieuwenhuis, Wildevuur, "Lung allograft rejection in the rat. I. Accelerated rejection caused by graft lymphocytes," *Transplantation*, 40:25-30, 1985. Prop, Wildevuur, Nieuwenhuis, "Lung allograft rejection in the rat. II. Specific immunological properties of lung grafts," *Transplantation*, 40:126-131, 1985. Sayagh, Watschinger, Carpenter, "Mechanisms of T cell recognition of alloantigen," *Transplantation*, 57:(9)1295-1302, 1994. Sayegh y Krensky, "Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides," *Kidney Int.*, supl. 53:S13-20, 1996. Sayegh, Khoury, Hancock, Weiner, Carpenter, "Induction of immunity and oral tolerance with polymorphic class II major histocompatibility complex allopeptides in the rat," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 7762-7766, 1992. Sayegh, Zhang, Hancock, Kwok, Carpenter, Weiner, "Down-regulation of the immune response to histocompatibility antigens and prevention of sensitization by skin allografts by orally administered alloantigen," *Transplantation*, 53:163-166, 1992. Sekine, Nowen, Heidler, Van Rooijen, Brown, Cummings, Wilkes, "Role of passenger leukocytes in allograft rejection--Effect of depletion donor alveolar Macrophages on the local production of TNF-alpha, T helper 1/Thelper 2 cytokines, IgG subclasses, and pathology in a rat model of lung transplantation," *J. Immunol.*, 159:4084-4093, 1997. Seyer y Kang, "Covalent structure of collagen: amino acid sequence of three cyanogen bromide-derived peptides from human alpha 1(V) collagen chain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 271(1):120-129, 1989. SivaSai, Smith, Poindexter, Sundaresan, Trulock, Lynch, Cooper, Patterson, Mohanakumar, "Indirect recognition of donor HLA class I peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome," *Transplantation*, 67(8):1094-1098, 1999. Smith Jr, Williams, Brandt, "Interaction of proteoglycans with pericellular (1 alpha, 2 alpha, 3 alpha) collagens of cartilage," *J. Biol. Chem.*, 260:10761-10767, 1985. Stark y Ostrow, *Training Manual Series, Laboratory Animal Technician*, American Association for Laboratory Animal Science, 181-182, 1990. Strober y Coffman, "Tolerance and immunity in the mucosal immune system," *Res. Immunol.*, 148:489-599, 1997. Trulock, "Lung transplantation," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155:789-818, 1997. VanBuskirk, Wakely, Sirak, Orosz, "Patterns of allosensitization in allograft recipients: long-term allograft acceptance is associated with active alloantibody production in conjunction with active inhibition of alloreactive delayed-type hypersensitivity," *Transplantation.*, 65:1115-1123, 1998. Westra, Prop, Kuijpers, "A paradox in heart and lung rejection," *Transplantation*, 49:826-828, 1990. Whitacre, Gienapp, Orosz, Bitar, "Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy," *J. Immunol.*, 147:2155-2163, 1991. Wilkes, Bowman, Cummings, Heidler, "Allogeneic bronchoalveolar lavage cells induce the histology and immunology of lung allograft rejection in recipient murine lungs. Role of ICAM-1 on donor cells," *Transplantation*, 67(6):890-896, 1999. Wilkes, Heidler, Bowen, Quinlan, Doyle, Cummings, Doerschuk, "Allogeneic bronchoalveolar lavage cells induce the histology of acute lung allograft rejection, and deposition of IGg2a in recipient murine lungs," *J. Immunol.*, 155:2775-2783, 1995. Wilkes, Thompson, Cummings, Bragg, Heidler, "Instillation of allogeneic lung macrophages and dendritic cells cause differential effects on local IFY- $\gamma$  production, lymphocytic bronchitis, and vasculitis in recipient murine lungs," *J. Leukoc. Biol.*, 64:578-586, 1998. Wilson, Ebringer, Ahmadi, Wrigglesworth, Tiwana, Fielder, Binder, Ettelaie, Cunningham, Joannou, Bansal, "Shared amino acid sequences between major histocompatibility complex class II glycoproteins, type XI collagen and Proteus mirabilis in rheumatoid arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, 54:216-220, 1995. Woessner Jr., "The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this immino acid," *Arch. Biochem. Biophys.*, 93:440-447, 1961. Yagyu, Steinhoff, Schafers, Dammenhayn, Haverich, Borst, "Comparison of mononuclear cell populations in bronchoalveolar lavage fluid in acute rejection after lung transplantation and Mycoplasma infection in rats," *J. Heart Transplant.*, 9:516-525, 1990. Yamagami, Tsuru, Ohkawa, Endo, Isobe, "Suppression of allograft rejection with anti-alpha beta T cell receptor antibody in rat corneal transplantation," *Transplantation*, 67:600-604, 1999. Yoshino, Quattrocchi, Weiner, "Suppression of antigen- induced arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen," *Arthritis Rheum.*, 38:1092-1096, 1995. Yousem, Berry, Cagle, Chamberlain, Husain, Hruban, Marchevsky, Ohori, Ritter, Stewart,

Tazelaar," "Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung rejection study group," J. Heart Lung Transplant, 15:1-15, 1996. Zheng, Markees, Hancock, Li, Greine, Li, Mordes, Sayegh, Rossini, Strom, "CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment," J. Immunol., 162:4983-4990, 1999.

5

## Ejemplos

### Ejemplo de referencia 1: La cantidad de anticuerpos anti-colágeno V aumenta en pacientes con EPOC

10 Se obtuvo plasma de voluntarios normales (adultos no fumadores, edad 18-55) y de voluntarios con enfisema documentado. Se detectaron los niveles de anticuerpos anti-colV en los pacientes con EPOC y en los sujetos sanos control mediante el ensayo de citometría de flujo con perlas según se describe en el documento WO 2007/120947.

15 Brevemente, 1) Perlas revestidas con estreptavidina (5  $\mu\text{m}$ , capacidad de unión 10-20  $\mu\text{g/l}$  x  $10^7$  perlas (Polyscience, Warrington, PA)) se lavaron dos veces con PBS estéril. Las perlas ( $1 \times 10^7$ ) se suspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de PBS con 40  $\mu\text{g}$  de colágeno de tipo V humano y se incubaron durante 60 minutos a 4 °C. 2) Se generó un control positivo siguiendo el mismo procedimiento de 1 anterior, empleando 20  $\mu\text{m}$  de anticuerpo de conejo contra anticuerpos de colágeno V humano (Bioten) (Abeam, Cambridge, MA). 3) Para cada ensayo, se lavaron  $1 \times 10^6$  de perlas conjugadas dos veces en PBS, y se incubaron en 100  $\mu\text{l}$  de PBS más 50  $\mu\text{l}$  de suero. Después de incubar durante 20 30 minutos a temperatura ambiente, las perlas se lavaron tres veces con PBS que contenía FCS al 10 %. 4) Las perlas se suspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de PBS + FBS al 10 % estéril y se incubaron durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo secundario. Generalmente, se emplean 5  $\mu\text{l}$  de un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con R-PE (Sigma, Saint Louis). Las perlas se lavaron tres veces con PBS que contenía FCS al 10 %, se suspendieron en 300  $\mu\text{l}$  de una disolución de PBS/FCS y se analizaron empleando un citómetro de flujo.

25

Tal como se muestra en la figura 1, los anticuerpos anti-colágeno de tipo V se encuentran en una cantidad significativamente alta en pacientes con EPOC (N = 16), comparado con los controles (N = 42).

### Ejemplo 2: La cantidad de anticuerpos anti-colágeno V aumenta en pacientes con asma

30

Se obtuvo plasma de voluntarios normales (adultos no fumadores, edad 18-55) y de voluntarios con asma crónico documentado. Se midieron los niveles de anticuerpos anti-colV en los pacientes con asma y en los sujetos voluntarios control mediante el ensayo de perlas según se indica en el ejemplo 1.

35 Tal como se muestra en la figura 2, se encontraron unos niveles altos de anticuerpos anti-colágeno de tipo V en 8 de 20 asmáticos.

### Ejemplo 3: El colágeno V intravenoso previene la hipersensibilidad de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina en ratones

40

Este ejemplo demuestra que la administración intravenosa de colágeno V previene la hipersensibilidad de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina en este modelo de asma murino bien establecido.

45 Ratones Balb/c fueron inyectados a través de la vena de la cola con 100  $\mu\text{g}$  de col(V), solo, o col(V) mezclado en adyuvante de Freund completo (CFA), o PBS, o CFA por sí solo. Siete días después, los ratones recibieron una inyección IP de ovoalbúmina en alumbre y esto se repitió siete días después. Siete días después de la última inyección de ovoalbúmina/alumbre, los ratones en cada grupo fueron expuestos a dosis crecientes de ovoalbúmina en aerosol, seguido de una medición de la resistencia de las vías respiratorias (PenH).

50 Los resultados demuestran que el col(V), por sí solo, anula la hipersensibilidad de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina (véase la figura 3). Se realizaron otros experimentos que confirmaron estos resultados. Estos resultados se resumen a continuación en la tabla 2.

Tabla 2: Col(V) por sí solo anula la hipersensibilidad de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina

	PBS				Col(V)				ANOVA de dos vías	
	Unidades PenH		N	Promedio	Unidades PenH		N	Promedio		
	ETM	ETM			ETM	ETM				
Metacolina mg/ml										
Línea basal	0,419913	0,021817	6	0,564856	0,092752	6	0,564856	0,092752	6	>0,05
Solución salina	0,466943	0,034769	6	0,519667	0,073273	6	0,519667	0,073273	6	>0,05
10	1,413495	0,189206	6	1,615039	0,172871	6	1,615039	0,172871	6	>0,05
25	2,448044	0,438264	6	2,914945	0,510278	6	2,914945	0,510278	6	>0,05
50	4,463914	0,319439	6	3,147791	0,531683	6	3,147791	0,531683	6	>0,05
100	5,121152	0,327822	6	3,661426	0,544324	6	3,661426	0,544324	6	>0,05
200	6,064105	0,368829	6	3,387585	0,46153	6	3,387585	0,46153	6	<0,001
300	6,825607	0,499452	6	3,700204	0,657257	6	3,700204	0,657257	6	<0,001

**Ejemplo 4: El col(V) intravenoso induce transcripciones de IFN- $\gamma$  en células mononucleares de pulmón**

5 Este ejemplo demuestra que la inyección intravenosa de col(V) por sí solo induce una respuesta de TH1 en células mononucleares de pulmón, que se caracteriza por la inducción de transcripciones de IFN- $\gamma$ . Ratones Balb/c fueron inyectados a través de la vena de la cola con 100 ug de col(V) solo, CFA solo en la base de cola, colV más CFA en la base de la cola, o PBS i.v. por sí solo. Siete días después, los ratones recibieron una inyección IP de ovoalbúmina en alumbre y esto se repitió siete días después. Siete días después de la última inyección de ovoalbúmina/alumbre, los ratones en cada grupo fueron expuestos a dosis crecientes de metacolina en aerosol, seguido de una medición de la resistencia de las vías respiratorias en respuesta a la exposición a metacolina (PenH). Se extrajo el ARN de células mononucleares aisladas a partir del parénquima pulmonar de ratones en cada grupo de tratamiento y se realizó una PCR cuantitativa para determinar los niveles de expresión de IL-4, IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$  e IL-10 (véase la figura 4; los datos representan el ARN de las células mononucleares de pulmón reunido procedente de 5 ratones en cada grupo).

15 Los resultados del experimento demuestran que col(V) por sí solo, administrado por vía intravenosa, induce transcripciones de IFN- $\gamma$  en células mononucleares de pulmón. El IFN- $\gamma$  es antagonista de IL-13 e IL4, dos citocinas que se cree que desempeñan un papel en la patogénesis del asma. Por tanto, aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, la inducción de esta respuesta de TH1, que contrarresta los efectos de IL4/IL13, puede desempeñar un papel en el efecto protector mediado por colV en el asma inducido por ovoalbúmina.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Wilkes, David
- 25 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA Y ASMA
- <130> 480266.404PC
- 30 <140> PCT
- <141> 22-04-2010
- <150> US 61/266.048
- 35 <151> 02-12-2009
- <150> US 61/171.705
- <151> 22-04-2009
- <160> 6
- 40 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 8439
- 45 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

cgcaactctcc gtccccgagg ctggcgcagg acctcaactcg agcgggagcgc ccacgggggag 60  
 cgggtcgagg ggcggcggcg gcgaggagga ggcgagaagg agttggagga ggaggaggag 120  
 gagggcaggc cgagctagcc cagcggggtc ccggccgccc cgcgggcaa agtcgagccc 180  
 tcccgcccggt gggcggagcgc gccagccgcc ccttccagaa cagccgcccgc cacaagaag 240  
 aacgggggggt gccgagggtcc ccatgacctc ctaaagtggg gcggtccctg ctgagtgcgc 300  
 tgcccggggcc gtgacccgag cccctgtgag tccccgcgag cctccgagcg cccctgtgag 360  
 ccccggcccg cgcgccgccc gcatggacgt ccataccgcy tggaaagcgc gcagcgcgct 420  
 ccgcccgggc gccccgctgc tgcccccgct gctgctgctg ctgctgtggg cgcgcctcc 480  
 gagccgcgca gctcagccag cagatctcct gaaggttcta gattttcaca acttgccctga 540  
 tggataaaca aagacaacag gcttttgccg cacgcggcga tcttccaaag gcccgatgt 600  
 cgcttacaga gtcaccaaag acgcgcagct cagcgcaccc accaagcagc tgtaccctgc 660  
 gtctgcattt cccgaggact tctccatcct aacaactgtg aaagccaaga aaggcagcca 720  
 ggccttctct gtctccatct acaacgagca gggatccag cagattgggc tggagctggg 780  
 ccgctctccc gtcttctct acgaggacca cacggggaag cctggcccgg aagactacc 840  
 cctcttccgg ggcataacc tgtcagatgg caagtggcac agaattgctc tcagcgtcca 900  
 caagaaaaat gtcaccttga tctcagactg taaaaagaag accaccaaat tcctcgaccg 960  
 cagcgcaccac cccatgatcg acatcaatgg catcatcgtg tttggcacc ggatcctgga 1020  
 tgaggagggtg tttgagggtg acatccagca gctgctctt gtctcggacc accgggcagc 1080  
 ttatgattac tgtgagcact acagccctga ctgtgacacc gcagtacctg acaccacca 1140  
 gtcgcaggac cccaatccag atgaatatta cacggaagga gacggcgagg gtgagaccta 1200  
 ttactacgaa taccctact acgaagacc cgaagacctg ggaaggagc ccaccccag 1260  
 caagaagccc gtggaagctg ccaaagaaac cacagaggtc cccgaggagc tgaccccagc 1320  
 ccccacggaa gctgctccca tgctgaaac cagtgaagg gctgggaagg aagaggact 1380  
 cggcatcggg gactatgact acgtgccag tgaggactac tacacgccc caccgatga 1440  
 tgacctcacc tatggcgagg gggaggagaa ccccgaccag cccacagacc caggcgctgg 1500  
 ggcgaaatt cccaccagca ccgcccacac ctccaactcc tccaatccag ctccgcctcc 1560  
 aggggaagggt gcggatgact tggaggggga gttcaactgag gaaacgatcc ggaacctga 1620  
 cgagaactac tacgaccct actacgacc caccagctcc ccgtcggaga tcgggcccggg 1680  
 aatgccggcg aaccaggata ccatctatga agggattgga ggacctcggg gcgagaaagg 1740  
 ccaaaaggga gaaccagcga ttatcgagcc gggcatgctc atcgagggcc cgcctggccc 1800  
 agaaggcccc gcgggtcttc ccggacctcc aggaaccatg ggtccactg gccagtccg 1860  
 ggacctgga gaaaggggcc cccctggagc cccaggcctt cctggggccg atggcctgcc 1920  
 cggctctcca ggaaccatgc tcatgctgcc ctccggttt ggaggtggcg gcgatgcggg 1980  
 ctccaaaggc cccatggtct cagcccagga gtcccaggcg caagccattc tccagcaggc 2040  
 caggttggca ctgaggggac cagctggccc gatgggtctc acagggagac ctggccctgt 2100

ggggcccccct gggagcggag gtttgaaggg cgagccggga gacgtggggc ctcagggctc 2160  
 tccaggtgtg caaggcccgc ctggctcggc cgggaagccc ggaagacggg gtcgggctgg 2220  
 gagtgatgga gccagaggaa tgcctggaca aactggcccc aagggtgacc ggggtttcga 2280  
 cggcctggct gggttgccag gcgagaaggg ccacaggggt gaccctggtc cttccggccc 2340  
 accaggacct ccgggagacg atggagaaag gggtgacgac ggagaagtg ggcccagggg 2400  
 gctgectggg gagcccgggc cacgtggctc gcttgggccc aaggggcccc caggtcctcc 2460  
 cggacctccc ggtgtcacgg gtatggacgg ccagccgggg ccaaaaggaa atgtgggtcc 2520  
 ccagggagag cctggcccc caggacagca gggtaatcca ggcgcccagg gtcttccagg 2580  
 cccccaggtt gcaattggtc ctccaggaga aaagggctcc ttggggaaac caggecctcc 2640  
 aggaatgccc ggtgtgacg gacccccggg acacctggc aaagaaggcc ctccaggaga 2700  
 gaaaggaggt cagggctccac ctggccccca gggctccgatt ggctaccag gtcctcgagg 2760  
 agtcaagggg gccgatggca tccgtggtct gaagggcaca aagggcgaga aggggtgaaga 2820  
 cggctttcct gggtttaaag gagacatggg catcaagggg gatcgggggg agatcggccc 2880  
 acccggctccc aggggagaag atggccctga aggcccaaa ggtcgcggag gtcccaatgg 2940  
 tgagcccggt cctctgggac cccctgggga gaaggaaaa ctcgagtc cagggttacc 3000  
 agggatcca ggaagacaag gaccaaagg ctctatgga ttccctggat ttcctggcgc 3060  
 caatggagag aagggcggca gggggacccc tggaaagcca ggaccgagg ggacgcgagg 3120  
 cccaacgggt ccgaggggtg aaagaggccc ccggggcatc actgggaagc ctggccccaa 3180  
 gggcaactcc ggaggtgacg gccacgctgg cctcctggt gaacggggac ccaatggacc 3240  
 ccaaggacct acaggatttc ctggaccaa gggccccct ggccctccag gcaaggatgg 3300  
 actccagga caccctggac agagaggcga gactggttc caaggcaaga ccggccctcc 3360  
 agtccccccc ggcgtggtcg gcctcaggg tcccacggga gaaacgggac caatgggtga 3420  
 gctggccac cctggcccc ctggaccccc cggtgaacag gggcttccgg gccttgcctg 3480  
 aaaagaaggg acgaaggggtg acccaggccc tgcaggcctc cctgggaaag atggccctcc 3540  
 aggattacgt ggtttccctg gggaccgagg gcttccctgg ccagtgggag ctcttggact 3600  
 gaaaggcaat gaagggcccc ctggccccacc aggcctgctg ggatctccag gggagagagg 3660  
 tccagctgga gccgctgggc ccatcggaat tccagggaga cctgggcccc agggaccccc 3720  
 agggccggca ggagagaaag gggctcctgg cgagaaaggc ccacaaggcc cagctggcgc 3780  
 agacggtctc caggggcctg tgggctccc gggctcaact ggcctgtgg gtccccctgg 3840  
 agaagcggga gataagggag agatcgggga gccggggcag aaaggaagca aggggggaca 3900  
 aggagaacag ggtcctcctg ggcctacagg tectcaagg cccatcggac agccaggccc 3960  
 ctctggagct gacggcgagc cggggcctcg gggccagcag ggccttttcg ggcagaaagg 4020  
 tgatgaaagt cccagaggtc ttccctggacc cectgggcca gtgggctgc aggggttgc 4080  
 aggacctcca ggcgagaagg gtgagacagg agcgtgggc cagatgggccc cccggggtcc 4140  
 cccctggcccc cagggaccct ccggagctcc aggtgctgat ggcacacaag gtccccctgg 4200  
 tggaaatgga aaccctggtg cagtgggaga gaagggcgag cctggcgaag cagggtgagc 4260  
 tggccttccg ggagaaggcg gccccccggg acccaaagga gaaaggggag agaagggcga 4320  
 gtcaggccct tcaggtgctg ccggaccccc tggacccaaa ggccctccc gagatgatgg 4380  
 tcccaaaggc agccctggcc cagtgggttt tccctggaat cctggcccc cgggagagcc 4440  
 tggccccgcg ggtcaagatg gtccccctgg tgacaaagga gatgatggtg aaccgggca 4500  
 gacgggatcc cccggcccta ctggtgaacc aggtccatcg gggcctccag gaaaagggg 4560  
 tccccaggc cccgacggc ccgaaggcag acagggagag aagggggcca agggagaagc 4620  
 cggcttggaa ggccctcctg ggaagactgg ccccatcggc cccaggggg cccctgggaa 4680  
 gcccggaccg gatggccttc gagggatccc tggccctgtg ggagaacaag gtctcccagg 4740  
 atccccaggc ccggacggtc cccccggccc catgggtccc ccaggacttc ccggcctcaa 4800  
 aggagattct ggtcccaaag gtgaaaaggg tcatccaggc ctgatcgggc tcatcggctc 4860  
 tccgggtgaa cagggtgaga agggcgaccg tggctcctcc ggcccccagg gctcctccgg 4920  
 tccaaaggga gaacagggta tcactggtcc ttctggccc attgggcctc ctgggcccc 4980  
 tggcctgccg ggtccgcctg gtccaaaagg tgctaagggc tectcgggtc caactggccc 5040  
 gaaggggtgag gcaggccacc caggaccccc agggcccccg ggccccccgg gagaggtcat 5100  
 ccagcccctg ccaatccagg catccaggac gcggcggaac atcgacgcca gccagctgct 5160  
 ggacgacggg aatggcgaga actacgtgga ctacgaggc ggcattggaag agatcttcgg 5220  
 ctctctcaac tctctgaagc tggagattga gcagatgaaa cggccccctg gcacgcagca 5280  
 gaaccccggc cgcacctgca aggacctgca gctctgccac cccgacttcc cagatggtga 5340  
 ataactgggt gatcctaacc aaggatgctc cagggttcc ttcaaggtt ccagcaactt 5400  
 cacagccggg gggtegacat gcgtcttccc tgacaaagag tccgaagggg ccagaatcac 5460  
 ttcttggccc aaagaaaacc cgggctcctg gttcagtga ttcaagcgtg ggaaactgct 5520  
 ctctatgtg gacgcccagg gcaaccctgt ggggtggtga cagatgacct tctcgggct 5580  
 gctgagcggc tctgcccacc agaacgtcac ctaccactgc taccagttag tggcctggca 5640  
 ggacgcagcc acgggcagct acgacaaggc cctccgcttc ctgggctcca acgacgagg 5700  
 gatgtcctat gacaacaacc cctacatccg cccctgggtg gacggctgtg ctaccaagaa 5760  
 aggtaccag aagacggtte tggagatcga cacccccaca gttggagcagg tgcccatcgt 5820  
 ggacatcatg ttcaatgact tccgtgaagc gtcacagaaa tttggattg aagtggggcc 5880  
 ggcttgcctc atgggctagg agcccgcgag cccgggctcc cgagagcaac ctctgacct 5940  
 cagcatgcca ttcgttcgtg agtgcctcgt gcacgtcctg accctggaca gtagaagctt 6000

```

ctccctcccc tcccacctga ettcatetac gecteggeac cacgggggtgt gggaccccag 6060
cccggagaga acagagggaa ggagccgcgc ccccacctgg agctgaatca catgacctag 6120
ctgcacccca gcgcctgggc ccgccccacg ctctgtccac acccacgcgc cccgggagcg 6180
gggccatgcc tccagcccc cagctcgccc gacctcctct gttcgtgaat aggtctcagg 6240
ggttggggga gggactgcca gatttggaca ctatatTTTT ttctaaattc aacttgaaga 6300
tgtgtatttc cctgacctt caaaaaatgt tccaaggtaa gcctcgtaa ggtcatcca 6360
ccatcaccaa agcctccgtt ttaacaacc tccaacacga tccatttaga ggccaaatgt 6420
cattctgcag gtgccttccc gatggattaa aggtgcttat gtttttTgtga gttttaagta 6480
aatatttgta ttgtattggt ataaatgta agtgtgcctg gctttcaatc atgcacggaa 6540
accagttctc agtcccacgg acagaatggg cgaggcatgg attctgggtt gcagtaccgt 6600
tctgattaga aataggaagt ctccccacc ccgcccctggc caagaacgtg caataaattg 6660
gaagtttgcc ccggggcagc aagaatttat gctgccattg aaaagcaggt accagtgcc 6720
cttttcagac agttttTgat tcgctctaga cttttttttt ttttaatagg gaaaaaattt 6780
gataattttc ttttttctac atgcacttaa gactaaaaca caggtttTgga ttaattttat 6840
ttgcttcctt tttccgcttt tcttcccga gagcctgatg ggagaatgtc cagggcaggg 6900
aaaccacatt ttttTtaggt gataactcaa tgaaaattgg tgcttatttt ttacacttct 6960
ctcttgTggc tctctTgtgg tgctatctat ctgTtttaag gtctcctTga aggcgcactg 7020
gggaccctgg coatgcctcg ttctccctgc tttctttatc ctgttattgc ctccacagtc 7080
tgttgccaag gactctaaga tcaatgcag tcactttcct tccactggg caggatagcc 7140
aagcacactc cctcctgcgc tctcccgcc cggTgcgtcc actcccgagg gctgttatga 7200
ggactgggtt gtgcctactt gattTgaaa cacacacaag caataaaaag cctcttctctg 7260
cattgtctgt ggtgtgacca tagcagatta tattTggttc ctgaatgttt gtggtgctaa 7320
tttctgtgtt tgttccaagc cgttcagtca tgccatgcgc tgccctcggt gatggagtaa 7380
tgtacaatga actccatgag tctctccagg gctgcctgca gcacgtcttt tccaagtagc 7440
ctatttggat tcccattctca aatgtcctgg atgcgagcgt cageggctcc agagetcggt 7500
gcgggtgagg tccccttTgg ggaaccttt cctggccatc gaggtcgggg ggetgcctc 7560
tgtgggcagg aggacctgag gggcagccag gaaaggcgt ctcttcaactg tgaaaagtTg 7620
cccgggtgca gcgccttttc ctctaccat gggaaatgca ggctgggccc ttggggTgag 7680
cctgcggggc tctggtgctg tcccgcacc ccaccaccac cagaatgcag ttccagctta 7740
ggaagccaca aacaagccac ccaggaggaa caaaacaccg ccagcgtgga ttttccaaat 7800
ttccctggaa agtaagtctc gctctTgcca aagaaaagtc tggctTggag agtctctgga 7860
gccaggatg ccagcatgtg ccaatgactg tcacctcat ctcttcaaaa gaaaagccat 7920
agccgaggac tgtcccgcga cccccgtgga ctgcgtctag gtcatgtgat tctgttttca 7980
tttctcatcc catccaattt gtccctttct cctgtcattt tcttctctctg tggteccctc 8040
aaagttgtta taattTgtac tgaacttcaa aatgtgtccc gttctcccca gaccactcta 8100
gccacagtat attgcaataa aattacttct tatattTgca gaaattcttt tggTgtaatt 8160
ttattttttc ctctcaatat atataattgg acaaacgctg gcaaaaagaa aaaaatggta 8220
agcaaaaaac ccaagataaa gtttcgagga catcaggcct tttgaaatac aatgtcaaat 8280
gacacattgt acggtttcaa aaaatccgct agacatgtca taagttttaa ctgtaatgcc 8340
caggaaagga tatcttaaaa tattctaaac ttgtgtaaca aaggaataat taactgtaat 8400
agtttttcaa taaatcgagt tgggtgtttc caccgtaaa 8439

```

- <210> 2
- <211> 1838
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <400> 2

5

ES 2 618 881 T3

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

ES 2 618 881 T3

130						135						140							
Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	Phe	Arg	Gly	Ile	Asn	Leu				
145					150					155					160				
Ser	Asp	Gly	Lys	Trp	His	Arg	Ile	Ala	Leu	Ser	Val	His	Lys	Lys	Asn				
				165					170					175					
Val	Thr	Leu	Ile	Leu	Asp	Cys	Lys	Lys	Lys	Thr	Thr	Lys	Phe	Leu	Asp				
			180					185					190						
Arg	Ser	Asp	His	Pro	Met	Ile	Asp	Ile	Asn	Gly	Ile	Ile	Val	Phe	Gly				
		195					200					205							
Thr	Arg	Ile	Leu	Asp	Glu	Glu	Val	Phe	Glu	Gly	Asp	Ile	Gln	Gln	Leu				
	210					215					220								
Leu	Phe	Val	Ser	Asp	His	Arg	Ala	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Glu	His	Tyr				
225					230					235					240				
Ser	Pro	Asp	Cys	Asp	Thr	Ala	Val	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	Ser	Gln	Asp				
				245					250					255					
Pro	Asn	Pro	Asp	Glu	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Gly	Asp	Gly	Glu	Gly	Glu	Thr				
			260					265					270						
Tyr	Tyr	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Pro	Glu	Asp	Leu	Gly	Lys				
		275					280					285							
Glu	Pro	Thr	Pro	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Glu	Ala	Ala	Lys	Glu	Thr	Thr				
	290					295					300								
Glu	Val	Pro	Glu	Glu	Leu	Thr	Pro	Thr	Pro	Thr	Glu	Ala	Ala	Pro	Met				
305					310					315					320				
Pro	Glu	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Lys	Glu	Glu	Asp	Val	Gly	Ile	Gly				
				325					330					335					
Asp	Tyr	Asp	Tyr	Val	Pro	Ser	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Pro	Ser	Pro	Tyr				
			340					345					350						
Asp	Asp	Leu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Gly	Glu	Glu	Asn	Pro	Asp	Gln	Pro	Thr				
		355					360					365							
Asp	Pro	Gly	Ala	Gly	Ala	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser				
		370				375					380								
Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Ala	Asp	Asp	Leu				
385					390					395				400					
Glu	Gly	Glu	Phe	Thr	Glu	Glu	Thr	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Glu	Asn	Tyr				
			405						410				415						
Tyr	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Thr	Ser	Ser	Pro	Ser	Glu	Ile	Gly	Pro				
			420					425					430						
Gly	Met	Pro	Ala	Asn	Gln	Asp	Thr	Ile	Tyr	Glu	Gly	Ile	Gly	Gly	Pro				
		435					440					445							
Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Gln	Lys	Gly	Glu	Pro	Ala	Ile	Ile	Glu	Pro	Gly				
		450				455					460								
Met	Leu	Ile	Glu	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Glu	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Pro				
465					470					475				480					
Gly	Pro	Pro	Gly	Thr	Met	Gly	Pro	Thr	Gly	Gln	Val	Gly	Asp	Pro	Gly				
				485					490				495						
Glu	Arg	Gly	Pro	Pro	Gly	Arg	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Asp	Gly	Leu				
			500					505					510						
Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Thr	Met	Leu	Met	Leu	Pro	Phe	Arg	Phe	Gly	Gly				
		515					520					525							
Gly	Gly	Asp	Ala	Gly	Ser	Lys	Gly	Pro	Met	Val	Ser	Ala	Gln	Glu	Ser				
		530				535					540								
Gln	Ala	Gln	Ala	Ile	Leu	Gln	Gln	Ala	Arg	Leu	Ala	Leu	Arg	Gly	Pro				
545					550					555				560					
Ala	Gly	Pro	Met	Gly	Leu	Thr	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Gly	Pro	Pro				
				565					570				575						
Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Asp	Val	Gly	Pro	Gln	Gly				
			580				585						590						
Pro	Arg	Gly	Val	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Lys	Pro	Gly	Arg				
		595					600					605							
Arg	Gly	Arg	Ala	Gly	Ser	Asp	Gly	Ala	Arg	Gly	Met	Pro	Gly	Gln	Thr				
		610				615					620								
Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Phe	Asp	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Pro	Gly				
625					630					635				640					
Glu	Lys	Gly	His	Arg	Gly	Asp	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro				
				645					650					655					

Pro Gly Asp Asp Gly Glu Arg Gly Asp Asp Gly Glu Val Gly Pro Arg  
 660 665 670  
 Gly Leu Pro Gly Glu Pro Gly Pro Arg Gly Leu Leu Gly Pro Lys Gly  
 675 680 685  
 Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Val Thr Gly Met Asp Gly Gln  
 690 695 700  
 Pro Gly Pro Lys Gly Asn Val Gly Pro Gln Gly Glu Pro Gly Pro Pro  
 705 710 715 720  
 Gly Gln Gln Gly Asn Pro Gly Ala Gln Gly Leu Pro Gly Pro Gln Gly  
 725 730 735  
 Ala Ile Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Pro Leu Gly Lys Pro Gly Leu  
 740 745 750  
 Pro Gly Met Pro Gly Ala Asp Gly Pro Pro Gly His Pro Gly Lys Glu  
 755 760 765  
 Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Gly Gln Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly  
 770 775 780  
 Pro Ile Gly Tyr Pro Gly Pro Arg Gly Val Lys Gly Ala Asp Gly Ile  
 785 790 795 800  
 Arg Gly Leu Lys Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Asp Gly Phe Pro  
 805 810 815  
 Gly Phe Lys Gly Asp Met Gly Ile Lys Gly Asp Arg Gly Glu Ile Gly  
 820 825 830  
 Pro Pro Gly Pro Arg Gly Glu Asp Gly Pro Glu Gly Pro Lys Gly Arg  
 835 840 845  
 Gly Gly Pro Asn Gly Asp Pro Gly Pro Leu Gly Pro Gly Glu Lys  
 850 855 860  
 Gly Lys Leu Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Tyr Pro Gly Arg Gln Gly  
 865 870 875 880  
 Pro Lys Gly Ser Ile Gly Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ala Asn Gly Glu  
 885 890 895  
 Lys Gly Gly Arg Gly Thr Pro Gly Lys Pro Gly Pro Arg Gly Gln Arg  
 900 905 910  
 Gly Pro Thr Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly Pro Arg Gly Ile Thr Gly  
 915 920 925  
 Lys Pro Gly Pro Lys Gly Asn Ser Gly Gly Asp Gly Pro Ala Gly Pro  
 930 935 940  
 Pro Gly Glu Arg Gly Pro Asn Gly Pro Gln Gly Pro Thr Gly Phe Pro  
 945 950 955 960  
 Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Lys Asp Gly Leu Pro Gly  
 965 970 975  
 His Pro Gly Gln Arg Gly Glu Thr Gly Phe Gln Gly Lys Thr Gly Pro  
 980 985 990  
 Pro Gly Pro Pro Gly Val Val Gly Pro Gln Gly Pro Thr Gly Glu Thr  
 995 1000 1005  
 Gly Pro Met Gly Glu Arg Gly His Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 1010 1015 1020  
 Glu Gln Gly Leu Pro Gly Leu Ala Gly Lys Glu Gly Thr Lys Gly Asp  
 1025 1030 1035 1040  
 Pro Gly Pro Ala Gly Leu Pro Gly Lys Asp Gly Pro Pro Gly Leu Arg  
 1045 1050 1055  
 Gly Phe Pro Gly Asp Arg Gly Leu Pro Gly Pro Val Gly Ala Leu Gly  
 1060 1065 1070  
 Leu Lys Gly Asn Glu Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ser  
 1075 1080 1085  
 Pro Gly Glu Arg Gly Pro Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ile Gly Ile Pro  
 1090 1095 1100  
 Gly Arg Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu Lys Gly  
 1105 1110 1115 1120  
 Ala Pro Gly Glu Lys Gly Pro Gln Gly Pro Ala Gly Arg Asp Gly Leu  
 1125 1130 1135  
 Gln Gly Pro Val Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Val Gly Pro Pro  
 1140 1145 1150  
 Gly Glu Asp Gly Asp Lys Gly Glu Ile Gly Glu Pro Gly Gln Lys Gly  
 1155 1160 1165  
 Ser Lys Gly Asp Lys Gly Glu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly Pro

1170	1175	1180
Gln Gly Pro Ile Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Asp Gly Glu Pro		
1185	1190	1195
Gly Pro Arg Gly Gln Gln Gly Leu Phe Gly Gln Lys Gly Asp Glu Gly		1200
	1205	1210
Pro Arg Gly Phe Pro Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Leu Gln Gly Leu		1215
	1220	1225
Pro Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Thr Gly Asp Val Gly Gln Met		1230
	1235	1240
Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Pro Ser Gly Ala Pro Gly		1245
	1250	1255
Ala Asp Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Gly Ile Gly Asn Pro Gly Ala		1260
1265	1270	1275
Val Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Gly Glu Pro Gly Leu Pro		1280
	1285	1290
Gly Glu Gly Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Glu Lys Gly		1295
	1300	1305
Glu Ser Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Pro		1310
	1315	1320
Pro Gly Asp Asp Gly Pro Lys Gly Ser Pro Gly Pro Val Gly Phe Pro		1325
	1330	1335
Gly Asp Pro Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Pro Ala Gly Gln Asp Gly		1340
1345	1350	1355
Pro Pro Gly Asp Lys Gly Asp Asp Gly Glu Pro Gly Gln Thr Gly Ser		1360
	1365	1370
Pro Gly Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Lys Arg		1375
	1380	1385
Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Glu Gly Arg Gln Gly Glu Lys Gly		1390
	1395	1400
Ala Lys Gly Glu Ala Gly Leu Glu Gly Pro Pro Gly Lys Thr Gly Pro		1405
	1410	1415
Ile Gly Pro Gln Gly Ala Pro Gly Lys Pro Gly Pro Asp Gly Leu Arg		1420
1425	1430	1435
Gly Ile Pro Gly Pro Val Gly Glu Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro Gly		1440
	1445	1450
Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Leu		1455
	1460	1465
Lys Gly Asp Ser Gly Pro Lys Gly Glu Lys Gly His Pro Gly Leu Ile		1470
	1475	1480
Gly Leu Ile Gly Pro Pro Gly Glu Gln Gly Glu Lys Gly Asp Arg Gly		1485
	1490	1495
Leu Pro Gly Pro Gln Gly Ser Ser Gly Pro Lys Gly Glu Gln Gly Ile		1500
1505	1510	1515
Thr Gly Pro Ser Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro		1520
	1525	1530
Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Ala Lys Gly Ser Ser Gly Pro Thr Gly		1535
	1540	1545
Pro Lys Gly Glu Ala Gly His Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro		1550
	1555	1560
Pro Gly Glu Val Ile Gln Pro Leu Pro Ile Gln Ala Ser Arg Thr Arg		1565
	1570	1575
Arg Asn Ile Asp Ala Ser Gln Leu Leu Asp Asp Gly Asn Gly Glu Asn		1580
1585	1590	1595
Tyr Val Asp Tyr Ala Asp Gly Met Glu Glu Ile Phe Gly Ser Leu Asn		1600
	1605	1610
Ser Leu Lys Leu Glu Ile Glu Gln Met Lys Arg Pro Leu Gly Thr Gln		1615
	1620	1625
Gln Asn Pro Ala Arg Thr Cys Lys Asp Leu Gln Leu Cys His Pro Asp		1630
	1635	1640
Phe Pro Asp Gly Glu Tyr Trp Val Asp Pro Asn Gln Gly Cys Ser Arg		1645
	1650	1655
Asp Ser Phe Lys Val Tyr Cys Asn Phe Thr Ala Gly Gly Ser Thr Cys		1660
1665	1670	1675
Val Phe Pro Asp Lys Lys Ser Glu Gly Ala Arg Ile Thr Ser Trp Pro		1680
	1685	1690
		1695

Lys Glu Asn Pro Gly Ser Trp Phe Ser Glu Phe Lys Arg Gly Lys Leu  
                   1700                  1705                  1710  
 Leu Ser Tyr Val Asp Ala Glu Gly Asn Pro Val Gly Val Val Gln Met  
                   1715                  1720                  1725  
 Thr Phe Leu Arg Leu Leu Ser Ala Ser Ala His Gln Asn Val Thr Tyr  
                   1730                  1735                  1740  
 His Cys Tyr Gln Ser Val Ala Trp Gln Asp Ala Ala Thr Gly Ser Tyr  
                   1745                  1750                  1755                  1760  
 Asp Lys Ala Leu Arg Phe Leu Gly Ser Asn Asp Glu Glu Met Ser Tyr  
                   1765                  1770                  1775  
 Asp Asn Asn Pro Tyr Ile Arg Ala Leu Val Asp Gly Cys Ala Thr Lys  
                   1780                  1785                  1790  
 Lys Gly Tyr Gln Lys Thr Val Leu Glu Ile Asp Thr Pro Lys Val Glu  
                   1795                  1800                  1805  
 Gln Val Pro Ile Val Asp Ile Met Phe Asn Asp Phe Gly Glu Ala Ser  
                   1810                  1815                  1820  
 Gln Lys Phe Gly Phe Glu Val Gly Pro Ala Cys Phe Met Gly  
                   1825                  1830                  1835

<210> 3  
 <211> 6930  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 3

5

gaccgttget	tggcagacac	tggatggta	tgagcctgaa	caagctgaaa	aggggcagga	60
aaagaagtgg	aggcagcatt	cttcctat	aaagctgcat	cgcttgaaaa	aagttttcgc	120
agactgtgct	ggagctgggtg	ctgaaaaagg	gggtttgcag	aggetgccct	ggggctgggtg	180
ctgaaagaag	agcccacagc	tgacttcatg	gtgctacaat	aacctcagaa	tctacttttc	240
actctcagga	gaaccacat	gtctaata	tagacatgat	ggcaactgg	gcggaagcaa	300
gacctctcct	cattcttatt	gttttattag	ggcaatttgt	ctcaataaaa	gccaggaag	360
aagacgagga	tgaaggatat	ggtgaagaaa	tagcctgcac	tcagaatggc	cagatgtact	420
taaacagggg	catttggaaa	cctgccctt	gtcagatctg	tgtctgtgac	aatggagcca	480
ttctctgtga	caagatagaa	tgccaggatg	tgctggactg	tgccgacct	gtaacgcccc	540
ctggggaatg	ctgtcctgtc	tgttcacaaa	cacctggagg	tggcaataca	aattttggta	600
gaggaagaaa	gggacaaaag	ggagaaccag	gattagtgcc	tggtgtaaca	ggcatacgtg	660
gtcgtccagg	accggcagga	cctccaggat	cacagggacc	aagaggagag	cgagggccaa	720
aaggaagacc	tggcctcgt	ggactcagg	gaattgatgg	agaaccaggt	gttcctggtc	780
aacctggtgc	tccaggacct	cctggacatc	cgccccacc	aggacctgat	ggcttgagca	840
ggccttttc	agctcaaatg	gctgggttg	atgaaaaatc	tggacttggg	agtcaagtag	900
gactaatgcc	tggctctgtg	ggtcctgtt	gcccaagggg	accacagggt	ttacaaggac	960
agcaaggtgg	tgccaggacct	acaggacctc	ctggtgaacc	tggtgatcct	ggaccaatgg	1020
gtccgattgg	ttcacgtgga	ccagagggcc	ctcctggtaa	acctggggaa	gatggtgaac	1080
ctggcagaaa	tggaaatcct	ggtgaagtgg	gatttgccag	atctccggga	gctcgtggat	1140
ttcctggggc	tctcgtctt	ccaggctctga	agggtcaccg	aggacacaaa	ggtcttgaag	1200
gccctaaagg	tgaagttgga	gcacctggtt	ccaaggggta	agctggcccc	actggtccaa	1260
tgggtgccat	gggtcctctg	ggtccgaggg	gaatgccagg	agagagaggg	agacttgggc	1320
cacaggggtg	tctcggacaa	cgaggtgcac	atggtatgcc	tggaaaacct	ggaccaatgg	1380
gtcctcttgg	gataccaggc	tcttctggtt	ttccaggaaa	tctcggaaatg	aagggagaag	1440
caggtcctac	aggggcgcga	ggcctgaag	gtcctcaggg	gcagagaggt	gaaactgggc	1500
ccccaggtcc	agttggctct	ccaggctctc	ctggtgcaat	aggaaactgat	ggtactcctg	1560
gtgccaaagg	cccaacgggc	tctccgggta	cctctggtcc	tctcggctca	gcagggcctc	1620
ctggatctcc	aggacctcag	ggtagcactg	gtcctcaggg	aattcgaggc	caaccgggtg	1680
atccaggagt	tccaggtttc	aaaggagaag	ctggcccaaa	aggggaacca	gggccacatg	1740
gtattcaggg	tccgataggc	ccacccggtg	aagaaggcaa	aagaggtccc	agaggtgacc	1800
caggaacagt	tggtectcca	gggccagtgg	gagaaagggg	tgctcctggc	aatcgtggtt	1860
ttccaggctc	tgatggttta	cctgggcccc	aggggtgctca	aggagaacgg	ggtcctgtag	1920
gttcttcagg	acccaaagga	agccaggggg	atccaggacg	tccaggggaa	cctgggcttc	1980
caggtgctcg	gggtttgaca	ggaaatcctg	gtgttcaagg	tcctgaagga	aaacttggtg	2040
ctttgggtgc	gccaggggaa	gatggccgtc	caggtcctcc	aggctccata	ggaatcagag	2100
ggcagccccg	gagcatgggc	cttcacggcc	ccaaaggtag	cagtgggtgac	cctgggaaac	2160
ctggagaagc	aggaaatgct	ggagttctg	ggcagagggg	agctcctgga	aaagatgggtg	2220
aagttggtcc	ttctggtcct	gtgggccccg	cggtctagc	tggtgaaaga	ggagaacaag	2280
gacctccagg	ccccacaggt	tttcaggggc	ttcctggtcc	tccagggcct	cctggagaag	2340

gtggaaaacc aggtgatcaa ggtgttcctg gagatcccgg agcagttggc ccgttaggac 2400  
 ctgagaggaga acgaggaaat cctggggaaa gaggagaacc tgggataact ggactccctg 2460  
 gtgagaaggg aatggctgga ggacatggct ctgatggccc aaaaggcagt ccaggtecat 2520  
 ctgggacccc tggagataca ggcccaccag gtcttcaagg tatgccggga gaaagaggaa 2580  
 ttgcaggaac tcctggcccc aaggggtgaca gaggtggcat aggagaaaaa ggtgctgaag 2640  
 gcacagctgg aaatgatggt gcaagaggtc ttccaggtcc tttgggcccct ccaggteccg 2700  
 caggtcctac tggagaaaag ggtgaacctg gtccctcaggy tttagttggc cctcctggct 2760  
 cccggggcaa tcctggttct cgaggtgaaa atggggcaac tggagctggt ggttttgccg 2820  
 gacccaggg tcctgacgga cagcctggag taaaagggtg acctggagag ccaggacaga 2880  
 agggagatgc tggttctcct ggaccacaag gtttagcagg atcccctggc cctcatggtc 2940  
 ctaatggtgt tcctggacta aaaggtggtc gaggaacca aggtccgcct ggtgctacag 3000  
 gatttcctgg ttctgcgggc agagttggac ctccaggccc tgctggagct ccaggacctg 3060  
 cgggacccct aggggaaccc gggaaggagg gacctccagg tcttcgtggg gacctggct 3120  
 ctcatgggag tgtgggagat cgaggaccag ctggcccccc tggtgccca ggagacaaag 3180  
 gggaccacag agaagatggg caacctggtc cagatggccc cctgggtcca cctggaacga 3240  
 ccgggcagag aggaattggt ggcatgctg ggcaacctg agagagaggc atgcccgcc 3300  
 taccagggcc agcgggaaca ccaggaaaag taggaccaac tggtgcaaca ggagataaag 3360  
 gtccacctgg acctgtgggg cccccaggct ccaatggtcc tgtaggggaa cctggaccag 3420  
 aaggtccagc tggcaatgat ggtaccccag gacgggatgg tgctggtgga gaacgtggtg 3480  
 atcgtggaga ccctgggccc gcaggtctgc caggctctca gggtgcccct ggaactcctg 3540  
 gcctgtggg tgctccagga gatgcaggac aaagaggaga tccgggttct cggggtccta 3600  
 taggacacc tggtcgagct gggaaacctg gattacctgg accccaagga cctcgtggtg 3660  
 acaaaggtga tcatgggagc cgaggcgaca gaggtcagaa gggccacaga ggctttactg 3720  
 gtcttcaggg tcttctggc cctcctggtc caaatggtga acaaggaagt gctggaatcc 3780  
 ctggaccatt tggcccaaga ggtcctccag gccagttgg tcttccaggt aaagaaggaa 3840  
 acctggggcc acttgggcca attggacctc caggtgtacg aggcagtgtg ggagaagcag 3900  
 gacctgaggg cctcctggt gacctggccc caectggccc tccgggtccc cctggcccac 3960  
 ttacagctgc tcttggggat atcatgatga actatgatga aagcatggca gatccactc 4020  
 ctgagtttac tgaagatcag gcggtctctg atgacaaaaa caaacggac ccaggggttc 4080  
 atgctacct gaagtcactc agtagtcaga ttgaaacccat ggcagcccc gatggctcga 4140  
 aaaagcacc agcccgcacg tgtgatgacc taaagctttg ccattccgca aagcagagtg 4200  
 gtgaatactg gattgatcct aaccaaggat ctggtgaaga tgcaatcaaa gtttactgca 4260  
 acatggaac aggagaaaca tgtatttcag caaacccatc cagtgtacca cgtaaaacct 4320  
 ggtggccag taaatctcct gacaataaac tggtttggtg atgaacagag 4380  
 ggtctcagtt cgcttatgga gaccaccaat cacctaatac agccattact cagatgactt 4440  
 ttttgcgccc tttatcaaaa gaagcctccc agaacatcac ttacatctgt aaaacagtg 4500  
 taggatcat ggacgatcaa gctaagaacc tcaaaaaagc tgtggttctc aaaggggcaa 4560  
 atgacttaga tatcaaaagca gagggaaata ttagattccg gtatatcgtt cttcaagaca 4620  
 cttgctctaa gcggaatgga aatgtgggca agactgtctt tgaatataga acacagaatg 4680  
 tggcacgctt gcccataca gatctgtct ctgtggatgt tggcggcaca gaccaggaat 4740  
 tcggcgttga aattgggcca gtttgttttg tgtaaagtaa gccaaagcac atcgacaatg 4800  
 agcaccacca tcaatgacca ccgccattca caagaacttt gactgtttga agttgatcct 4860  
 gagactcctg aagtaatggc tgatcctgca tcagcattgt atatatggtc ttaagtgcct 4920  
 ggctcctta tccttcagaa tatttatttt acttacaatc ctcaagtttt aattgatttt 4980  
 aaatatttt caatacaaca gtttaggttt aagatgacca atgacaatga ccacctttgc 5040  
 agaaatgaaa ctgattgaaat aaataaatct coggtttctt caatttattt cagtgtaatg 5100  
 aaaaagttgc ttagtattta tgaggaaatt cttcttctct gcaggtagct taaagagtg 5160  
 ggtatataga gccacaacac atgtttattt tgcttggctg cagttgaaaa atagaaatta 5220  
 gtgcocttt gtgacctctc attccaagat tgtcaattaa aaatgagttt aaaatgttta 5280  
 acttgtgatc gagacctaca tgcatgtctt gatattgtgt aactataata gagactcctt 5340  
 aaggagaatc ttaaaaaaa aaaaacgttt ctcaactgtc taaatagaat ttttaaatag 5400  
 tatataattca gtggcatttt ggagaacaaa gtgaatttac ttcgacttct taaattttg 5460  
 taaaagacta taagtttaga catctttctc attcaattt aaagatatct ttctcctct 5520  
 gatcaatcta tcaatattga tagaagtcac actagtatat accatttaat acatttacac 5580  
 tttctattt aagaagatat tgaatgcaaa ataattgaca tatagaactt tacaacata 5640  
 tgtccaagga ctctaaattg agactcctcc acatgtacaa tctcatcctc ctgaagccta 5700  
 taatgaagaa aaagatctag aaactgagtt gtggagctga ctctaataca atgtgatgat 5760  
 tggaaatgaga ccatttggcc tttgaacttt ctataggaaa atgacccaac atttcttagc 5820  
 atgagctacc tcatctctag aagctgggat ggacttacta ttcttgttta tattttagat 5880  
 actgaaagg gctatgcttc tgttattatt ccaagactgg agataggcag ggctaaaaag 5940  
 gtattattat ttttcttata atgatggtgc taaaattcct cctataaaat tcttaaaaa 6000  
 taagatggt ttaatcacta ccattgtgaa aacataactg ttagacttcc cgtttctgaa 6060  
 agaaagagca tcgttccaat gcttggttcac tgttctctct tcatactgta tctggaatgc 6120  
 tttgtaatac ttgcattgct cttagaccag aacatgtagg tcccctgtg tctcaactc 6180  
 tttttttct taattgcatt tgttggctct attttaattt ttttcttta aataaacag 6240

ES 2 618 881 T3

```
ctgggacat cccaaaagac aagccatgca tacaactttg gtcatgtatc tctgcaaagc 6300
atcaaattaa atgcacgctt ttgtcatgtc agtggttttt gttttgtgaa attcctttga 6360
ccatattaga tctatttcat ttccaatagt gaaaaggaga tgtgggtgga tactttgttt 6420
gccatttggt taaaagatac aacggatacc ttctatcatg tatgtactgg cttataaatg 6480
aaaatctatc tacaacatta cccacaaagg caacatgaca ccaattatca ctgcctctgc 6540
ccttaaaaaat gtcagagtag tattattgat aaaaagggca agcaatagat ttttcatgac 6600
tgaataaaact gtaataataa aacatattgc tcaaagtgta tcacatatga atttagccta 6660
attgttttca gtttcattct caatatttag tttacaacat cattttcccc taaactgggt 6720
atattttgac ctgtatatct taaatttgag tatttatatg cctaaataca tgtgtgagtt 6780
ttgtttgact tccaagtcca aactataaga ttatataagt tcatatagat gaatcagaaa 6840
tatgtggtaa tactattaag tcacaaacac taacaatttc caactataga aataacagtt 6900
cttatttggg ttttgggaat gctaccaata 6930
```

<210> 4

<211> 1499

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Met Ala Asn Trp Ala Glu Ala Arg Pro Leu Leu Ile Leu Ile Val  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Gly Gln Phe Val Ser Ile Lys Ala Gln Glu Glu Asp Glu Asp  
 20 25 30  
 Glu Gly Tyr Gly Glu Glu Ile Ala Cys Thr Gln Asn Gly Gln Met Tyr  
 35 40 45  
 Leu Asn Arg Asp Ile Trp Lys Pro Ala Pro Cys Gln Ile Cys Val Cys  
 50 55 60  
 Asp Asn Gly Ala Ile Leu Cys Asp Lys Ile Glu Cys Gln Asp Val Leu  
 65 70 75 80  
 Asp Cys Ala Asp Pro Val Thr Pro Pro Gly Glu Cys Cys Pro Val Cys  
 85 90 95  
 Ser Gln Thr Pro Gly Gly Gly Asn Thr Asn Phe Gly Arg Gly Arg Lys  
 100 105 110  
 Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Leu Val Pro Val Val Thr Gly Ile Arg  
 115 120 125  
 Gly Arg Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ser Gln Gly Pro Arg Gly  
 130 135 140  
 Glu Arg Gly Pro Lys Gly Arg Pro Gly Pro Arg Gly Pro Gln Gly Ile  
 145 150 155 160  
 Asp Gly Glu Pro Gly Val Pro Gly Gln Pro Gly Ala Pro Gly Pro Pro  
 165 170 175  
 Gly His Pro Ser His Pro Gly Pro Asp Gly Leu Ser Arg Pro Phe Ser  
 180 185 190  
 Ala Gln Met Ala Gly Leu Asp Glu Lys Ser Gly Leu Gly Ser Gln Val  
 195 200 205  
 Gly Leu Met Pro Gly Ser Val Gly Pro Val Gly Pro Arg Gly Pro Gln  
 210 215 220  
 Gly Leu Gln Gly Gln Gln Gly Gly Ala Gly Pro Thr Gly Pro Pro Gly  
 225 230 235 240  
 Glu Pro Gly Asp Pro Gly Pro Met Gly Pro Ile Gly Ser Arg Gly Pro  
 245 250 255  
 Glu Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly Glu Asp Gly Glu Pro Gly Arg Asn  
 260 265 270  
 Gly Asn Pro Gly Glu Val Gly Phe Ala Gly Ser Pro Gly Ala Arg Gly  
 275 280 285  
 Phe Pro Gly Ala Pro Gly Leu Pro Gly Leu Lys Gly His Arg Gly His  
 290 295 300  
 Lys Gly Leu Glu Gly Pro Lys Gly Glu Val Gly Ala Pro Gly Ser Lys  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Ala Gly Pro Thr Gly Pro Met Gly Ala Met Gly Pro Leu Gly  
 325 330 335  
 Pro Arg Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Arg Leu Gly Pro Gln Gly Ala  
 340 345 350  
 Pro Gly Gln Arg Gly Ala His Gly Met Pro Gly Lys Pro Gly Pro Met  
 355 360 365

Gly Pro Leu Gly Ile Pro Gly Ser Ser Gly Phe Pro Gly Asn Pro Gly  
 370 375 380  
 Met Lys Gly Glu Ala Gly Pro Thr Gly Ala Arg Gly Pro Glu Gly Pro  
 385 390 395 400  
 Gln Gly Gln Arg Gly Glu Thr Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Ser Pro  
 405 410 415  
 Gly Leu Pro Gly Ala Ile Gly Thr Asp Gly Thr Pro Gly Ala Lys Gly  
 420 425 430  
 Pro Thr Gly Ser Pro Gly Thr Ser Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly Pro  
 435 440 445  
 Pro Gly Ser Pro Gly Pro Gln Gly Ser Thr Gly Pro Gln Gly Ile Arg  
 450 455 460  
 Gly Gln Pro Gly Asp Pro Gly Val Pro Gly Phe Lys Gly Glu Ala Gly  
 465 470 475 480  
 Pro Lys Gly Glu Pro Gly Pro His Gly Ile Gln Gly Pro Ile Gly Pro  
 485 490 495  
 Pro Gly Glu Glu Gly Lys Arg Gly Pro Arg Gly Asp Pro Gly Thr Val  
 500 505 510  
 Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Asn Arg Gly  
 515 520 525  
 Phe Pro Gly Ser Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Ala Gln Gly Glu  
 530 535 540  
 Arg Gly Pro Val Gly Ser Ser Gly Pro Lys Gly Ser Gln Gly Asp Pro  
 545 550 555 560  
 Gly Arg Pro Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly  
 565 570 575  
 Asn Pro Gly Val Gln Gly Pro Glu Gly Lys Leu Gly Pro Leu Gly Ala  
 580 585 590  
 Pro Gly Glu Asp Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Ser Ile Gly Ile Arg  
 595 600 605  
 Gly Gln Pro Gly Ser Met Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Ser Ser Gly  
 610 615 620  
 Asp Pro Gly Lys Pro Gly Glu Ala Gly Asn Ala Gly Val Pro Gly Gln  
 625 630 635 640  
 Arg Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Glu Val Gly Pro Ser Gly Pro Val  
 645 650 655  
 Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln Gly Pro Pro Gly  
 660 665 670  
 Pro Thr Gly Phe Gln Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gly Glu  
 675 680 685  
 Gly Gly Lys Pro Gly Asp Gln Gly Val Pro Gly Asp Pro Gly Ala Val  
 690 695 700  
 Gly Pro Leu Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly Asn Pro Gly Glu Arg Gly  
 705 710 715 720  
 Glu Pro Gly Ile Thr Gly Leu Pro Gly Glu Lys Gly Met Ala Gly Gly  
 725 730 735  
 His Gly Pro Asp Gly Pro Lys Gly Ser Pro Gly Pro Ser Gly Thr Pro  
 740 745 750  
 Gly Asp Thr Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly  
 755 760 765  
 Ile Ala Gly Thr Pro Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Gly Ile Gly Glu  
 770 775 780  
 Lys Gly Ala Glu Gly Thr Ala Gly Asn Asp Gly Ala Arg Gly Leu Pro  
 785 790 795 800  
 Gly Pro Leu Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly Glu Lys Gly  
 805 810 815  
 Glu Pro Gly Pro Arg Gly Leu Val Gly Pro Pro Gly Ser Arg Gly Asn  
 820 825 830  
 Pro Gly Ser Arg Gly Glu Asn Gly Pro Thr Gly Ala Val Gly Phe Ala  
 835 840 845  
 Gly Pro Gln Gly Pro Asp Gly Gln Pro Gly Val Lys Gly Glu Pro Gly  
 850 855 860  
 Glu Pro Gly Gln Lys Gly Asp Ala Gly Ser Pro Gly Pro Gln Gly Leu  
 865 870 875 880  
 Ala Gly Ser Pro Gly Pro His Gly Pro Asn Gly Val Pro Gly Leu Lys

				885						890				895	
Gly	Gly	Arg	Gly	Thr	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Gly	Phe	Pro	Gly
			900					905					910		
Ser	Ala	Gly	Arg	Val	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro
		915					920					925			
Ala	Gly	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Arg
	930					935					940				
Gly	Asp	Pro	Gly	Ser	His	Gly	Arg	Val	Gly	Asp	Arg	Gly	Pro	Ala	Gly
945					950					955					960
Pro	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Gly	Asp	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Gln
				965					970					975	
Pro	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Thr	Thr	Gly	Gln	Arg
			980					985					990		
Gly	Ile	Val	Gly	Met	Pro	Gly	Gln	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Met	Pro	Gly
	995						1000						1005		
Leu	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Thr	Pro	Gly	Lys	Val	Gly	Pro	Thr	Gly	Ala
	1010						1015				1020				
Thr	Gly	Asp	Lys	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Val	Gly	Pro	Pro	Gly	Ser	Asn
1025					1030					1035					1040
Gly	Pro	Val	Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Glu	Gly	Pro	Ala	Gly	Asn	Asp	Gly
				1045					1050					1055	
Thr	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly	Ala	Val	Gly	Glu	Arg	Gly	Asp	Arg	Gly	Asp
			1060					1065						1070	
Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Pro	Gly	Ser	Gln	Gly	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro
		1075					1080					1085			
Gly	Pro	Val	Gly	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Gly	Gln	Arg	Gly	Asp	Pro	Gly
	1090						1095					1100			
Ser	Arg	Gly	Pro	Ile	Gly	Pro	Pro	Gly	Arg	Ala	Gly	Lys	Arg	Gly	Leu
1105					1110						1115				1120
Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro	Arg	Gly	Asp	Lys	Gly	Asp	His	Gly	Asp	Arg
				1125					1130					1135	
Gly	Asp	Arg	Gly	Gln	Lys	Gly	His	Arg	Gly	Phe	Thr	Gly	Leu	Gln	Gly
			1140					1145						1150	
Leu	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Asn	Gly	Glu	Gln	Gly	Ser	Ala	Gly	Ile
		1155					1160					1165			
Pro	Gly	Pro	Phe	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Val	Gly	Pro	Ser
		1170				1175						1180			
Gly	Lys	Glu	Gly	Asn	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Ile	Gly	Pro	Pro	Gly
1185					1190					1195					1200
Val	Arg	Gly	Ser	Val	Gly	Glu	Ala	Gly	Pro	Glu	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu
				1205						1210					1215
Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	His	Leu	Thr	Ala	Ala
			1220					1225						1230	
Leu	Gly	Asp	Ile	Met	Gly	His	Tyr	Asp	Glu	Ser	Met	Pro	Asp	Pro	Leu
	1235						1240						1245		
Pro	Glu	Phe	Thr	Glu	Asp	Gln	Ala	Ala	Pro	Asp	Asp	Lys	Asn	Lys	Thr
	1250					1255					1260				
Asp	Pro	Gly	Val	His	Ala	Thr	Leu	Lys	Ser	Leu	Ser	Ser	Gln	Ile	Glu
1265					1270						1275				1280
Thr	Met	Arg	Ser	Pro	Asp	Gly	Ser	Lys	Lys	His	Pro	Ala	Arg	Thr	Cys
				1285						1290					1295
Asp	Asp	Leu	Lys	Leu	Cys	His	Ser	Ala	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Tyr	Trp
			1300					1305						1310	
Ile	Asp	Pro	Asn	Gln	Gly	Ser	Val	Glu	Asp	Ala	Ile	Lys	Val	Tyr	Cys
		1315					1320						1325		
Asn	Met	Glu	Thr	Gly	Glu	Thr	Cys	Ile	Ser	Ala	Asn	Pro	Ser	Ser	Val
	1330					1335					1340				
Pro	Arg	Lys	Thr	Trp	Trp	Ala	Ser	Lys	Ser	Pro	Asp	Asn	Lys	Pro	Val
1345						1350					1355				1360
Trp	Tyr	Gly	Leu	Asp	Met	Asn	Arg	Gly	Ser	Gln	Phe	Ala	Tyr	Gly	Asp
				1365						1370					1375
His	Gln	Ser	Pro	Asn	Thr	Ala	Ile	Thr	Gln	Met	Thr	Phe	Leu	Arg	Leu
			1380					1385						1390	
Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Tyr	Ile	Cys	Lys	Asn	Ser
		1395					1400						1405		

ES 2 618 881 T3

```

Val Gly Tyr Met Asp Asp Gln Ala Lys Asn Leu Lys Lys Ala Val Val
  1410                1415                1420
Leu Lys Gly Ala Asn Asp Leu Asp Ile Lys Ala Glu Gly Asn Ile Arg
1425                1430                1435                1440
Phe Arg Tyr Ile Val Leu Gln Asp Thr Cys Ser Lys Arg Asn Gly Asn
                1445                1450                1455
Val Gly Lys Thr Val Phe Glu Tyr Arg Thr Gln Asn Val Ala Arg Leu
                1460                1465                1470
Pro Ile Ile Asp Leu Ala Pro Val Asp Val Gly Gly Thr Asp Gln Glu
                1475                1480                1485
Phe Gly Val Glu Ile Gly Pro Val Cys Phe Val
  1490                1495

```

<210> 5

<211> 6192

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

gcgagtgact gcaccgagcc cgagaagtgc ccgcgcccc cagccgcccc gactgggtcc 60  
 ccgccttgcc cgtgggcccc gccgggatgg ggaaccgccc ggacctgggc cagccgcggg 120  
 ccggtctctg cctgctcctg gccgcgctgc agcttctgcc ggggacgcag gccgatcctg 180  
 tggatgtcct gaaggccctg ggtgtgcagg gaggccaggc tggggctccc gagggcctg 240  
 gcttctgtcc ccagaggact ccagaggggtg accgggcatt cagaattggc caggccagca 300  
 cgctcgcat cccacgtgg gaactcttcc cagaaggcca ctttctgag aacttctcct 360  
 tgctgatcac cttgccccga cagccagcca atcagtctgt cctgctgtcc atttatgatg 420  
 aaaggggtgc ccggcagttg ggccctggcac tggggccagc gctgggtctc ctaggtgacc 480  
 ccttccgccc cctccccag caggtcaacc tcacagatgg caggtggcac cgtgtggccg 540  
 tcagcataga tggtgagatg gtgaccctgg tagctgactg tgaagctcag cccctgttt 600  
 tgggccatgg cccccgcttc atcagcatag ctggactcac tgtgctgggg acccaggacc 660  
 ttggggaaaa gactttcgag ggagacattc aggagctgct gataagcca gatcctcagg 720  
 ctgccttcca ggcttgtgag cggtagcttc ccgactgtga caacctggca ccggcagcca 780  
 cagtggtccc ccagggtgaa ccagaaaacc ctcgctctcg gcgggaagggg aagggaaaag 840  
 ggaggaagaa agggcgaggt cgcaagggga agggcaggaa aaagaacaag gaaatttggg 900  
 cctcaagtcc acctcctgac tccgagaga accagacct cactgacatc cccaagacag 960  
 agactccagc tccaaatctg cctccgacct ccacgccttt ggtcgtcacc tccactgtga 1020  
 ctactggact caatgccacg atcctagaga ggagcttggg ccctgacagt ggaaccgagc 1080  
 tggggaccct ggagaccaag gcagccaggg aggatgaaga aggagatgat tccaccatgg 1140  
 gccctgactt ccgggcagca gaatatccat ctoggactca gttccagatc tttcctgggtg 1200  
 ctggagagaa aggagcaaaa ggagagcccg cagtgattga aaaggggcag cagtttgagg 1260  
 gacctccagg agccccagga ccccaagggg tggttggccc ctcaggccct cccggcccc 1320  
 caggattccc tggcgacctt ggtccacggg gccctgctgg cctcccagga atccccggca 1380  
 ttgatgggat ccgagggcca ccgggcactg tgatcatgat gccgttccag tttgcaggcg 1440  
 gctcctttaa aggccttcca gtctcattcc agcaggcca ggctcaggca gttctcagc 1500  
 agactcagct ctctatgaaa ggccccctg gtccagtggg gctcactggg cgcccaggcc 1560  
 ctgtgggtct ccccgggcat ccaggtctga aaggagagga gggagcagaa gggccacagg 1620  
 gtccccgagg cctgcaggga cctcatggac cccctggccg agtgggcaag atgggcccgc 1680  
 ctggagcaga tggagctcgg ggctcccag gggacactgg acctaagggt gatcgtggct 1740  
 tcgatggcct ccctgggctg cctgggtgaga agggccaaag gggtgacttt ggccatgtgg 1800  
 ggcaaccggy tccccagga gaggatggtg agaggggagc agagggacct ccagggccca 1860  
 ctggccaggc tggggagccg ggtccacgag gactgcttgg ccccagaggc tctcctggcc 1920  
 ccacgggtcg cccgggtgtg actggaattg atggtgctcc tggtgccaaa ggcaatgtgg 1980  
 gtctccagg agaaccaggc cctccgggac agcagggaaa ccatgggtcc cagggactcc 2040  
 ccggtcccc gggactcatt ggcactcctg gggagaaggg tccccctgga aaccagga 2100  
 ttccaggcct ccaggatcc gatggcctc tgggtcacc aggacatgag ggccccacgg 2160  
 gagagaaagg ggctcagggg ccaccagggt cggcaggccc tccgggctat cctggacctc 2220  
 ggggagtga gggcacttca ggcaaccggg gcctccaggg ggagaaaggc gagaagggag 2280  
 aggacggctt cccaggttc aagggcgatg tggggctcaa aggtgatcag gggaaaccgc 2340  
 gagctccagg tccccgggga gaggatggtc ctgaggggcc gaaggggcag gcggggcagg 2400  
 ctggcgagga ggggccccca ggctcagctg gggagaaggg caagcttggg gtgccaggcc 2460  
 tcccaggtta tccaggacgc cctggacctg agggatctat tggatttccc ggtccctgg 2520  
 gacctatagg agagaaaggg aagtccggaa agacagggca gccaggcctg gaaggagagc 2580  
 ggggaccacc aggttcccgt ggagagaggg ggcaaccggg tgccacaggg caaccaggcc 2640  
 ccaagggcga tgtgggccag gatggagccc ctgggatccc tggagaaaag ggcctccctg 2700

gtctgcaagg	ccctccagga	ttccctgggc	caaagggccc	ccctggtcac	caaggtaaa	2760
atgggcgacc	agggcaccct	ggacagagag	gagaactggg	cttccaaggt	cagacaggcc	2820
cgcttgacc	agctgggtgc	ttaggccctc	agggaaagac	aggagaagtg	ggacctctag	2880
gtgaaagggg	gcctccaggc	ccccctggac	ctcctgggga	acaaggtctt	cctggcctgg	2940
aaggcagaga	gggggccaag	ggggaaactgg	gaccaccagg	accccttggg	aaagaagggc	3000
cagctggact	caggggcttt	cccggcccca	aagggggccc	tggggacccg	ggacctactg	3060
gcttaaaggg	tgataagggc	ccccagggc	ccgtgggggc	caatggctcc	cctggtgagc	3120
gcggtccttt	gggcccagca	ggaggcattg	gacttcctgg	ccaaagtggc	agcgaaggcc	3180
ccgttggccc	tgacaggcaag	aaggggtccc	ggggagaacg	tggcccccct	ggccccactg	3240
gcaaagatgg	gatcccaggg	cccctggggc	ctctgggacc	ccctggagct	gctgggcctt	3300
ctggcgagga	aggggacaag	ggggatgtgg	gtgccccggg	acacaagggg	agttaaaggcg	3360
ataaaggaga	cgcgggccca	cctggacaac	cagggtacag	gggtcctgca	ggacacccag	3420
gtcccccggg	agcagacggg	gctcaggggc	gcccgggacc	cccaggcctc	tttgggcaga	3480
aaggagatga	cggagtccaga	ggctttgtgg	gggtgattgg	ccctcctgga	ctgcaggggc	3540
tgccaggccc	tccgggagag	aaaggggagg	toggagacgt	cgggtccatg	ggtccccatg	3600
gagctccagg	tcctcgggggt	ccccaaaggcc	ccactggatc	agagggcact	ccagggtctgc	3660
ctggaggagt	tggtcagcca	ggcgccgtgg	gtgagaaggg	tgagcgaggg	gacgtctggag	3720
accagggccc	tccaggagcc	ccaggcatcc	cggggcccaa	gggagacatt	ggtgaaaagg	3780
gggactcagg	cccactctga	gctgctggac	ccccagggca	gaaaggtccc	cctggagagg	3840
atggagccaa	agggagcgtg	ggccccacgg	ggctgcccgg	agatctaggg	ccccagggag	3900
accctggagt	ttcaggcata	gatgggtccc	caggggagaa	gggagaccct	ggtgatgttg	3960
ggggaccggg	tccgcctgga	gcttctgggg	agcccggcgc	ccccgggccc	cccggaaga	4020
ggggctcttc	agggccacatg	ggtcgagaag	gcagagaagg	ggagaaaggt	gccaaggggg	4080
agccaggtcc	tgatgggccc	ccagggagga	cgggtccaat	gggggctaga	gggccccctg	4140
gacgtgtggg	gcctgagggt	cttcgagggg	tccctggccc	tgtgggtgaa	ccaggcctcc	4200
tgggagcccc	tggacagatg	ggccctcctg	gccccctggg	gcctctggc	ctcccagggc	4260
tgaagggaga	cactggcccc	aagggggaaa	agggccacat	tggattgatc	ggtctcattg	4320
gccccccggg	agaagctggg	gagaaaggag	atcaggggtt	gccaggcgtg	cagggacccc	4380
ctggteccaa	gggagaccct	ggtccccctg	gtcccattgg	ctctctgggc	cacctgggc	4440
ccccaggtgt	ggcgggccct	ctaggcacaga	aaggctcaaa	agggtctccg	gggtccatgg	4500
gccccctgtg	agacactgga	cctgcaggcc	caccagggcc	cccgggtgcc	cctgccgagc	4560
tgcattgggt	gcgcagggcg	cggcgcttcg	tcccagtcct	gcttccagtc	gtggagggcg	4620
gcctggagga	ggtgctggcc	tcgctccat	cgctgagctt	ggagctggag	cagctgcggc	4680
gtcctcccgg	cactgcggag	cgcccggggc	tcgtgtgcca	cgagctgcac	cgcaaccacc	4740
cgcacctgcc	tgatggggaa	tactggattg	accccaccca	gggctgcgcg	cgggactcgt	4800
tcagggtttt	ttgcaacttc	acggcgggag	gagagacctg	cctctatccc	gacaagaagt	4860
ttgagatcgg	gaaattggcc	tccctggcca	aggaaaagcc	tggaggctgg	tatagcacat	4920
tcctgcgagg	gaagaagtct	tcctacgtgg	acgccgacgg	gtcccagtg	aatgtcgtgc	4980
agctgaactt	cctgaaactg	ctgagtgcc	cagctcgcca	gaacttcacc	tactcctgcc	5040
agaatgcagc	tgctggctg	gacgaagcca	cgggtgacta	cagccactcc	gcccgttcc	5100
ttggcaccaa	tggagaggag	ctgtctttca	accagacgac	agcagccact	gtcagcgtcc	5160
cccaggatgg	ctgccggctc	cggaaaggac	agacgaagac	ccttttcgaa	ttcagctctt	5220
ctcgagcggg	atctctgccc	ctgtgggatg	tggcggccac	tgaacttggc	cagacgaacc	5280
aaaagtttgg	gtttgaaactg	ggccccgtct	gcttcagcag	ctgagagtgt	ccggggtggg	5340
agggaccatg	agggagcccc	agaatggggg	gcatttgggtg	ctgaggcttt	gaagccaccg	5400
tattttctgt	tacctgtgac	tatggagcca	atgggatgtg	acttcgctca	tcacggacag	5460
tcattccttc	tcctttccag	ggtgctgggg	gctgggggtc	cctggcccaa	gggtccagcc	5520
tcctctcacc	ccattccagg	tggcatactg	cagtctggct	ctttctcccc	tcctcccca	5580
cccaagcctc	acctccccac	cccttgaacc	cccatgcaat	gagcttctaa	ctcagagctg	5640
atgaacaaaa	gcccccccac	ccccaatgcc	tgcctcctca	ctcctccgtc	gctgcccttc	5700
acaccttttg	gtgctacccc	tcccagagt	taagcactgg	atgtctcctg	atcccaggct	5760
gggaccccta	ccccacccc	ctttgatcct	ttctacttcc	acggtgaaag	gactgagggtc	5820
ggactacaga	gggaagaggg	acttccttg	actgggttgt	gtttcttttc	ctgcctcagc	5880
ccagctctgc	aaatcccctc	cccctgcccc	ccacctcccc	aggetcacct	tgccatgcca	5940
ggtgggttgg	gttggggggg	gttggggggg	tgaatcagga	tcctaattgg	gctgcctat	6000
ttatacctgg	gtctgtatta	aaagggaaaag	tccccctgt	tgtagatttc	atctgcttcc	6060
tccttaggga	aggctgggat	atgatgagag	attccagccc	aagcctggcc	ccccaccgcc	6120
aggccatagg	gcataatttg	catctcaaat	ctgagaataa	actgatgaac	tgtgaaaaaa	6180
aaaaaaaaaa	aa					6192

<210> 6  
<211> 1745  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

ES 2 618 881 T3

Met Gly Asn Arg Arg Asp Leu Gly Gln Pro Arg Ala Gly Leu Cys Leu  
1 5 10 15  
Leu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Gly Thr Gln Ala Asp Pro Val  
20 25 30  
Asp Val Leu Lys Ala Leu Gly Val Gln Gly Gly Gln Ala Gly Val Pro  
35 40 45  
Glu Gly Pro Gly Phe Cys Pro Gln Arg Thr Pro Glu Gly Asp Arg Ala  
50 55 60  
Phe Arg Ile Gly Gln Ala Ser Thr Leu Gly Ile Pro Thr Trp Glu Leu  
65 70 75 80  
Phe Pro Glu Gly His Phe Pro Glu Asn Phe Ser Leu Leu Ile Thr Leu  
85 90 95  
Arg Gly Gln Pro Ala Asn Gln Ser Val Leu Leu Ser Ile Tyr Asp Glu  
100 105 110  
Arg Gly Ala Arg Gln Leu Gly Leu Ala Leu Gly Pro Ala Leu Gly Leu  
115 120 125  
Leu Gly Asp Pro Phe Arg Pro Leu Pro Gln Gln Val Asn Leu Thr Asp  
130 135 140  
Gly Arg Trp His Arg Val Ala Val Ser Ile Asp Gly Glu Met Val Thr  
145 150 155 160  
Leu Val Ala Asp Cys Glu Ala Gln Pro Pro Val Leu Gly His Gly Pro  
165 170 175  
Arg Phe Ile Ser Ile Ala Gly Leu Thr Val Leu Gly Thr Gln Asp Leu  
180 185 190  
Gly Glu Lys Thr Phe Glu Gly Asp Ile Gln Glu Leu Leu Ile Ser Pro  
195 200 205  
Asp Pro Gln Ala Ala Phe Gln Ala Cys Glu Arg Tyr Leu Pro Asp Cys  
210 215 220  
Asp Asn Leu Ala Pro Ala Ala Thr Val Ala Pro Gln Gly Glu Pro Glu  
225 230 235 240  
Thr Pro Arg Pro Arg Arg Lys Gly Lys Gly Lys Gly Arg Lys Lys Gly  
245 250 255  
Arg Gly Arg Lys Gly Lys Gly Arg Lys Lys Asn Lys Glu Ile Trp Thr  
260 265 270  
Ser Ser Pro Pro Asp Ser Ala Glu Asn Gln Thr Ser Thr Asp Ile  
275 280 285  
Pro Lys Thr Glu Thr Pro Ala Pro Asn Leu Pro Pro Thr Pro Thr Pro  
290 295 300  
Leu Val Val Thr Ser Thr Val Thr Thr Gly Leu Asn Ala Thr Ile Leu  
305 310 315 320  
Glu Arg Ser Leu Asp Pro Asp Ser Gly Thr Glu Leu Gly Thr Leu Glu  
325 330 335  
Thr Lys Ala Ala Arg Glu Asp Glu Glu Gly Asp Asp Ser Thr Met Gly  
340 345 350  
Pro Asp Phe Arg Ala Ala Glu Tyr Pro Ser Arg Thr Gln Phe Gln Ile  
355 360 365  
Phe Pro Gly Ala Gly Glu Lys Gly Ala Lys Gly Glu Pro Ala Val Ile  
370 375 380  
Glu Lys Gly Gln Gln Phe Glu Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Gln  
385 390 395 400  
Gly Val Val Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly  
405 410 415  
Asp Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Leu Pro Gly Ile Pro Gly Ile  
420 425 430  
Asp Gly Ile Arg Gly Pro Pro Gly Thr Val Ile Met Met Pro Phe Gln  
435 440 445  
Phe Ala Gly Gly Ser Phe Lys Gly Pro Pro Val Ser Phe Gln Gln Ala  
450 455 460  
Gln Ala Gln Ala Val Leu Gln Gln Thr Gln Leu Ser Met Lys Gly Pro  
465 470 475 480  
Pro Gly Pro Val Gly Leu Thr Gly Arg Pro Gly Pro Val Gly Leu Pro  
485 490 495  
Gly His Pro Gly Leu Lys Gly Glu Glu Gly Ala Glu Gly Pro Gln Gly  
500 505 510

Pro Arg Gly Leu Gln Gly Pro His Gly Pro Pro Gly Arg Val Gly Lys  
 515 520 525  
 Met Gly Arg Pro Gly Ala Asp Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly Asp Thr  
 530 535 540  
 Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Phe Asp Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly  
 545 550 555 560  
 Glu Lys Gly Gln Arg Gly Asp Phe Gly His Val Gly Gln Pro Gly Pro  
 565 570 575  
 Pro Gly Glu Asp Gly Glu Arg Gly Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Thr  
 580 585 590  
 Gly Gln Ala Gly Glu Pro Gly Pro Arg Gly Leu Leu Gly Pro Arg Gly  
 595 600 605  
 Ser Pro Gly Pro Thr Gly Arg Pro Gly Val Thr Gly Ile Asp Gly Ala  
 610 615 620  
 Pro Gly Ala Lys Gly Asn Val Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Pro Pro  
 625 630 635 640  
 Gly Gln Gln Gly Asn His Gly Ser Gln Gly Leu Pro Gly Pro Gln Gly  
 645 650 655  
 Leu Ile Gly Thr Pro Gly Glu Lys Gly Pro Pro Gly Asn Pro Gly Ile  
 660 665 670  
 Pro Gly Leu Pro Gly Ser Asp Gly Pro Leu Gly His Pro Gly His Glu  
 675 680 685  
 Gly Pro Thr Gly Glu Lys Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly  
 690 695 700  
 Pro Pro Gly Tyr Pro Gly Pro Arg Gly Val Lys Gly Thr Ser Gly Asn  
 705 710 715 720  
 Arg Gly Leu Gln Gly Glu Lys Gly Glu Lys Gly Glu Asp Gly Phe Pro  
 725 730 735  
 Gly Phe Lys Gly Asp Val Gly Leu Lys Gly Asp Gln Gly Lys Pro Gly  
 740 745 750  
 Ala Pro Gly Pro Arg Gly Glu Asp Gly Pro Glu Gly Pro Lys Gly Gln  
 755 760 765  
 Ala Gly Gln Ala Gly Glu Glu Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Lys  
 770 775 780  
 Gly Lys Leu Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Tyr Pro Gly Arg Pro Gly  
 785 790 795 800  
 Pro Lys Gly Ser Ile Gly Phe Pro Gly Pro Leu Gly Pro Ile Gly Glu  
 805 810 815  
 Lys Gly Lys Ser Gly Lys Thr Gly Gln Pro Gly Leu Glu Gly Glu Arg  
 820 825 830  
 Gly Pro Pro Gly Ser Arg Gly Glu Arg Gly Gln Pro Gly Ala Thr Gly  
 835 840 845  
 Gln Pro Gly Pro Lys Gly Asp Val Gly Gln Asp Gly Ala Pro Gly Ile  
 850 855 860  
 Pro Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Phe Pro  
 865 870 875 880  
 Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly His Gln Gly Lys Asp Gly Arg Pro Gly  
 885 890 895  
 His Pro Gly Gln Arg Gly Glu Leu Gly Phe Gln Gly Gln Thr Gly Pro  
 900 905 910  
 Pro Gly Pro Ala Gly Val Leu Gly Pro Gln Gly Lys Thr Gly Glu Val  
 915 920 925  
 Gly Pro Leu Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 930 935 940  
 Glu Gln Gly Leu Pro Gly Leu Glu Gly Arg Glu Gly Ala Lys Gly Glu  
 945 950 955 960  
 Leu Gly Pro Pro Gly Pro Leu Gly Lys Glu Gly Pro Ala Gly Leu Arg  
 965 970 975  
 Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Gly Pro Gly Asp Pro Gly Pro Thr Gly  
 980 985 990  
 Leu Lys Gly Asp Lys Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Ala Asn Gly Ser  
 995 1000 1005  
 Pro Gly Glu Arg Gly Pro Leu Gly Pro Ala Gly Gly Ile Gly Leu Pro  
 1010 1015 1020  
 Gly Gln Ser Gly Ser Glu Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Lys Gly

1025						1030					1035				1040
Ser	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Thr	Gly	Lys	Asp	Gly	Ile
					1045				1050					1055	
Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Ser
			1060					1065					1070		
Gly	Glu	Glu	Gly	Asp	Lys	Gly	Asp	Val	Gly	Ala	Pro	Gly	His	Lys	Gly
			1075				1080					1085			
Ser	Lys	Gly	Asp	Lys	Gly	Asp	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Gln	Pro	Gly	Ile
	1090					1095					1100				
Arg	Gly	Pro	Ala	Gly	His	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Gln
1105					1110					1115					1120
Gly	Arg	Arg	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Phe	Gly	Gln	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly
				1125					1130					1135	
Val	Arg	Gly	Phe	Val	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Leu
			1140					1145					1150		
Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Val	Gly	Ser	Met
			1155				1160				1165				
Gly	Pro	His	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro	Thr	Gly
	1170					1175				1180					
Ser	Glu	Gly	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Gly	Val	Gly	Gln	Pro	Gly	Ala
1185					1190					1195					1200
Val	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly	Asp	Ala	Gly	Asp	Pro	Gly	Pro	Pro
				1205				1210						1215	
Gly	Ala	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Ile	Gly	Glu	Lys	Gly
			1220					1225					1230		
Asp	Ser	Gly	Pro	Ser	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Lys	Lys	Gly	Pro
		1235				1240					1245				
Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Ala	Lys	Gly	Ser	Val	Gly	Pro	Thr	Gly	Leu	Pro
		1250				1255					1260				
Gly	Asp	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	Asp	Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Gly
1265				1270						1275					1280
Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Gly	Asp	Val	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro
				1285				1290						1295	
Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	Glu	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Lys	Arg
			1300					1305						1310	
Gly	Pro	Ser	Gly	His	Met	Gly	Arg	Glu	Gly	Arg	Glu	Gly	Glu	Lys	Gly
		1315				1320						1325			
Ala	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro	Pro	Gly	Arg	Thr	Gly	Pro
		1330				1335						1340			
Met	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro	Pro	Gly	Arg	Val	Gly	Pro	Glu	Gly	Leu	Arg
1345					1350					1355					1360
Gly	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Gly	Glu	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Gly
			1365					1370							1375
Gln	Met	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Ser	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu
			1380					1385					1390		
Lys	Gly	Asp	Thr	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	His	Ile	Gly	Leu	Ile
		1395					1400					1405			
Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Ala	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Gln	Gly
	1410					1415						1420			
Leu	Pro	Gly	Val	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Pro	Gly	Pro
1425					1430						1435				1440
Pro	Gly	Pro	Ile	Gly	Ser	Leu	Gly	His	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Val	Ala
			1445					1450						1455	
Gly	Pro	Leu	Gly	Gln	Lys	Gly	Ser	Lys	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Met	Gly
			1460					1465					1470		
Pro	Arg	Gly	Asp	Thr	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala
		1475					1480					1485			
Pro	Ala	Glu	Leu	His	Gly	Leu	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Phe	Val	Pro	Val
		1490				1495						1500			
Pro	Leu	Pro	Val	Val	Glu	Gly	Gly	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Ser	Leu
1505					1510						1515				1520
Thr	Ser	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Thr
				1525						1530					1535
Ala	Glu	Arg	Pro	Gly	Leu	Val	Cys	His	Glu	Leu	His	Arg	Asn	His	Pro
			1540					1545						1550	

ES 2 618 881 T3

His Leu Pro Asp Gly Glu Tyr Trp Ile Asp Pro Asn Gln Gly Cys Ala  
 1555 1560 1565  
 Arg Asp Ser Phe Arg Val Phe Cys Asn Phe Thr Ala Gly Gly Glu Thr  
 1570 1575 1580  
 Cys Leu Tyr Pro Asp Lys Lys Phe Glu Ile Val Lys Leu Ala Ser Trp  
 1585 1590 1595 1600  
 Ser Lys Glu Lys Pro Gly Gly Trp Tyr Ser Thr Phe Arg Arg Gly Lys  
 1605 1610 1615  
 Lys Phe Ser Tyr Val Asp Ala Asp Gly Ser Pro Val Asn Val Val Gln  
 1620 1625 1630  
 Leu Asn Phe Leu Lys Leu Leu Ser Ala Thr Ala Arg Gln Asn Phe Thr  
 1635 1640 1645  
 Tyr Ser Cys Gln Asn Ala Ala Ala Trp Leu Asp Glu Ala Thr Gly Asp  
 1650 1655 1660  
 Tyr Ser His Ser Ala Arg Phe Leu Gly Thr Asn Gly Glu Glu Leu Ser  
 1665 1670 1675 1680  
 Phe Asn Gln Thr Thr Ala Ala Thr Val Ser Val Pro Gln Asp Gly Cys  
 1685 1690 1695  
 Arg Leu Arg Lys Gly Gln Thr Lys Thr Leu Phe Glu Phe Ser Ser Ser  
 1700 1705 1710  
 Arg Ala Gly Phe Leu Pro Leu Trp Asp Val Ala Ala Thr Asp Phe Gly  
 1715 1720 1725  
 Gln Thr Asn Gln Lys Phe Gly Phe Glu Leu Gly Pro Val Cys Phe Ser  
 1730 1735 1740  
 Ser  
 1745

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento del asma en un paciente, o para su uso en la prevención del desarrollo o el empeoramiento del asma en un sujeto que está en riesgo de desarrollar asma, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos tolerogénicos.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el paciente padece enfisema o bronquitis obstructiva crónica.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en la que el colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos tolerogénicos, se prepara para la administración oral.
4. La composición de la reivindicación 3, que comprende entre 0,1 mg y 0,5 mg de colágeno de tipo V.
- 15 5. La composición de la reivindicación 1, en la que el colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos tolerogénicos, se prepara para la administración intravenosa, la instilación intrapulmonar, la administración mediante inhalación, o para la administración intramuscular.
- 20 6. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un broncodilatador o para su uso junto con un broncodilatador.
7. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un corticosteroide o para su uso junto con un corticosteroide.
- 25 8. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un modificador de leucotrienos o para su uso junto con un modificador de leucotrienos.
- 30 9. Un método para identificar a un individuo en riesgo de desarrollar asma, o para identificar un paciente con asma como candidato a una terapia de tolerancia al colágeno V, que comprende:  
poner en contacto al menos una porción de una muestra de sangre procedente del paciente con colágeno V, o uno de sus fragmentos antigénicos; y  
medir el nivel de anticuerpos que se unen al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos;
- 35 en el que la presencia de anticuerpos que se unen específicamente al colágeno V es indicativa de que el paciente con asma se beneficiaría de una terapia de tolerancia al colágeno V.
- 40 10. El método de la reivindicación 9, en el que el colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos antigénicos, está conjugado con una perla.
- 45 11. El método de la reivindicación 9, en el que la medición comprende:  
poner en contacto los anticuerpos que se unen específicamente al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, con un anticuerpo anti-IgG marcado con fluorescencia; y  
detectar, mediante citometría de flujo, la cantidad de anticuerpo anti-IgG marcado con fluorescencia unido a los anticuerpos unidos al colágeno V.
- 50 12. Un método para controlar el avance del asma en un individuo, que comprende:  
poner en contacto al menos una porción de una primera muestra de sangre procedente del individuo con colágeno V, o con uno de sus fragmentos antigénicos;  
medir el nivel de anticuerpos que se unen específicamente al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, en la primera muestra de sangre;
- 55 poner en contacto al menos una porción de una segunda muestra de sangre procedente del individuo extraída en un momento posterior, con colágeno V, o con uno de sus fragmentos antigénicos;
- 60 medir el nivel de anticuerpos que se unen específicamente al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, en la segunda muestra de sangre; y  
comparar el nivel de anticuerpos que se unen específicamente al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, en la segunda muestra de sangre con el nivel de anticuerpos que se unen específicamente al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, en la primera muestra de sangre;
- 65

en el que un aumento en el nivel de anticuerpos que se unen al colágeno V en la segunda muestra, comparado con la primera muestra, es indicativo de un empeoramiento del asma, y una disminución en el nivel de anticuerpos unidos al colágeno V en la segunda muestra, comparado con la primera muestra, es indicativa de una mejoría del asma.

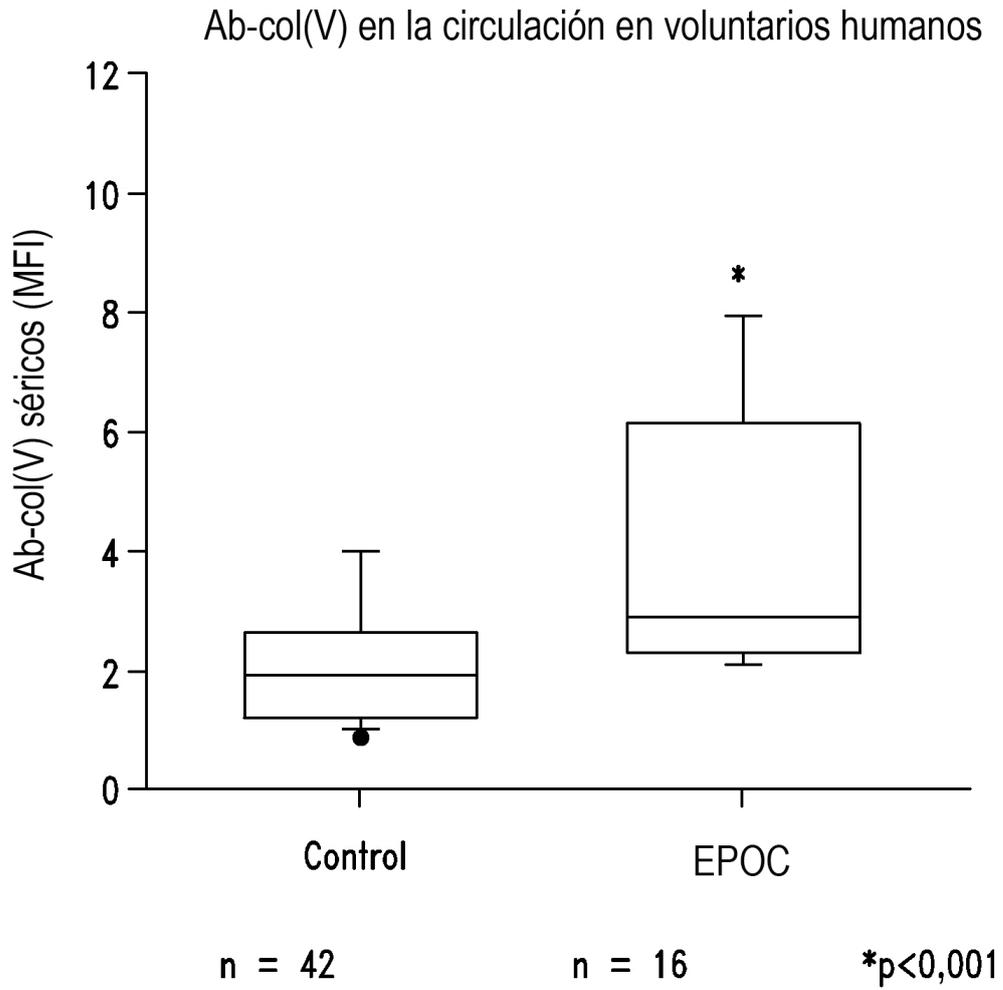
5 13. El método de la reivindicación 12, en el que el colágeno de tipo V, o uno de sus fragmentos antigénicos, está conjugado con una perla.

10 14. El método de la reivindicación 12, en el que la medición comprende:  
poner en contacto los anticuerpos que se unen al colágeno V, o a uno de sus fragmentos antigénicos, con un anticuerpo anti-IgG marcado con fluorescencia; y

15 detectar, mediante citometría de flujo, la cantidad de anticuerpo anti-IgG marcado con fluorescencia unido a los anticuerpos unidos al colágeno V.

15. El método de la reivindicación 14 u 11, en el que el anticuerpo anti-IgG detecta uno o más de los subtipos de IgG seleccionados de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

El nivel de anticuerpos anti-col(V)  
séricos aumenta en pacientes con EPOC



*FIG. 1*

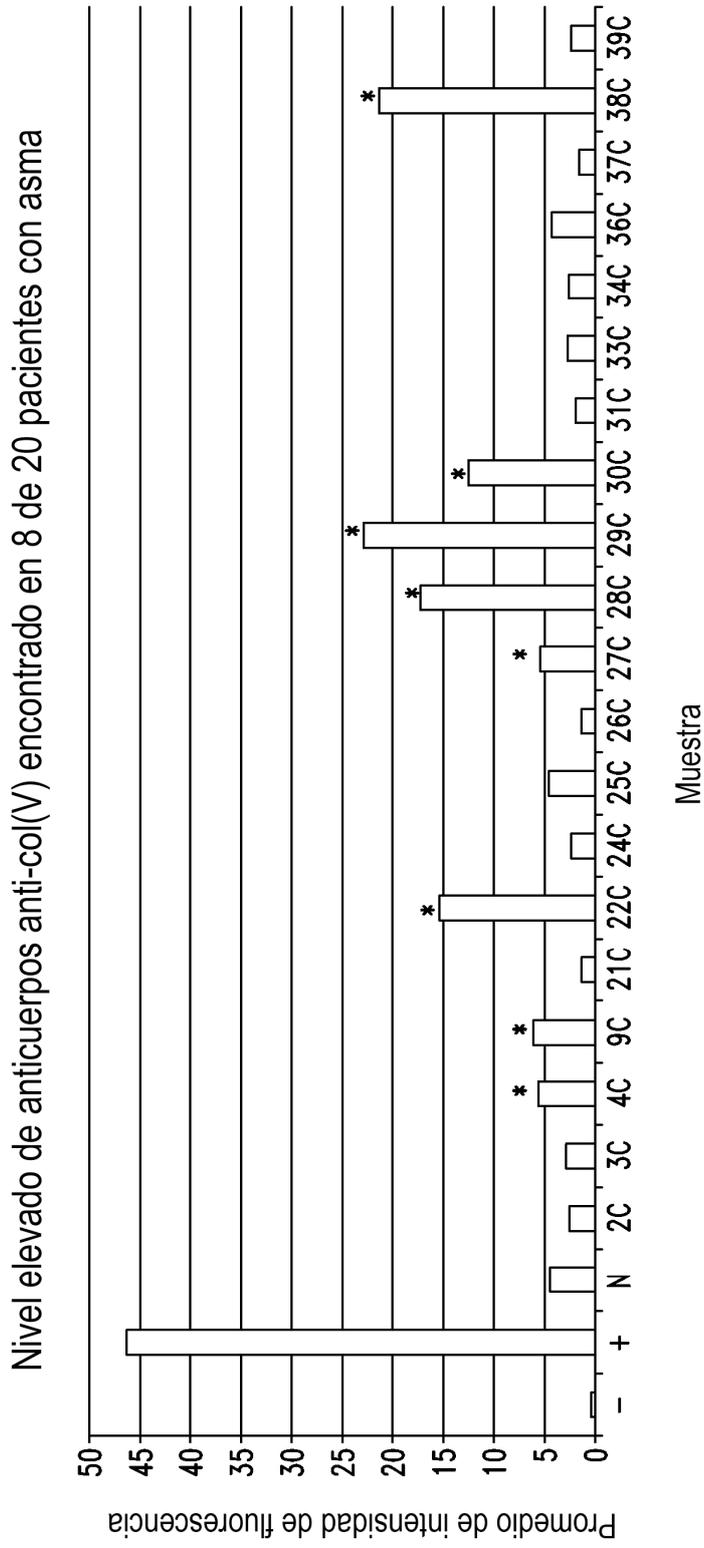
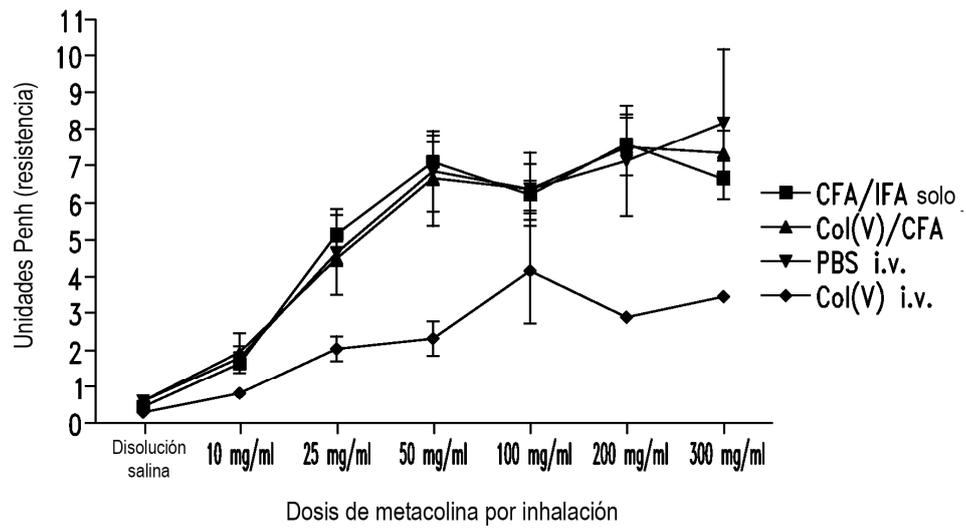


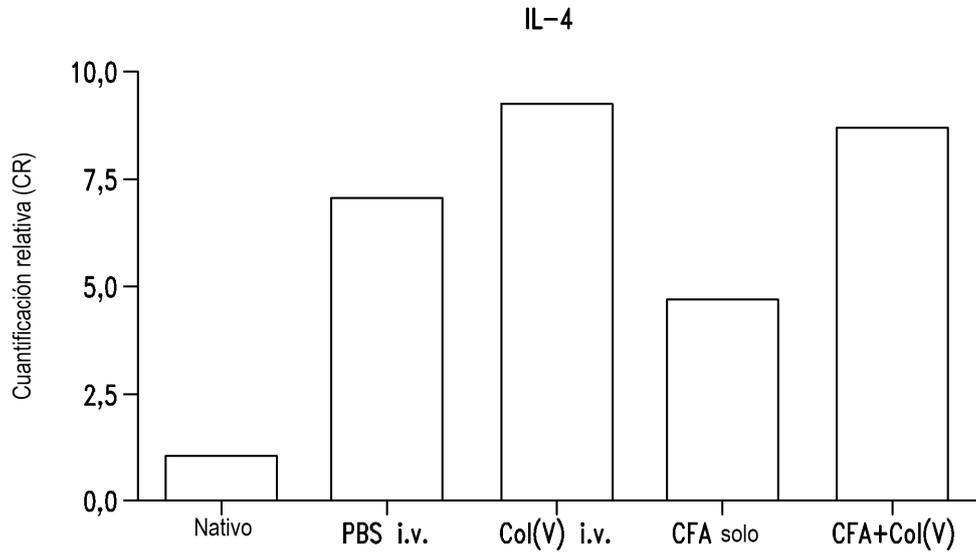
FIG. 2

Hiperrespuesta de las vías respiratorias en ratones después de un tratamiento con col(V) y ovoalbúmina/alumbre

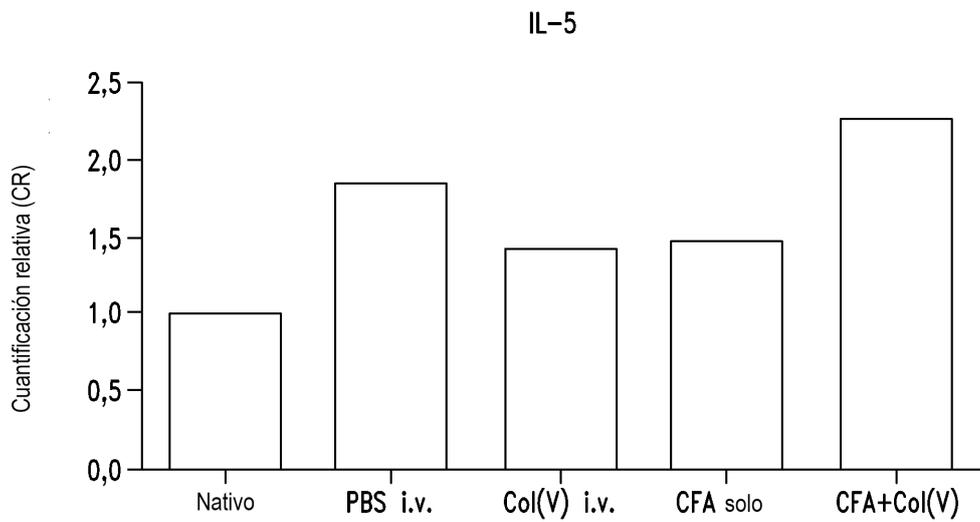


**FIG. 3**

Niveles de transcripciones de células mononucleares pulmonares

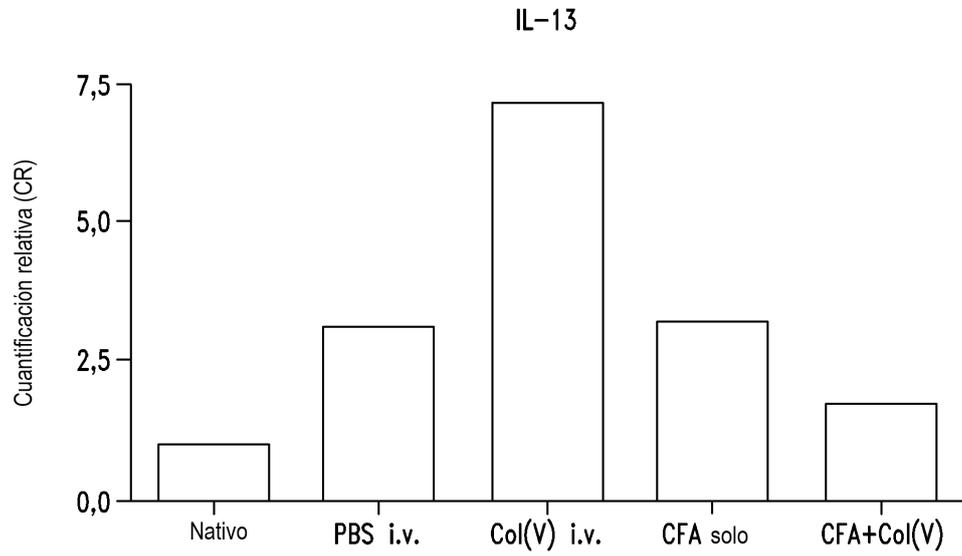


*FIG. 4A*

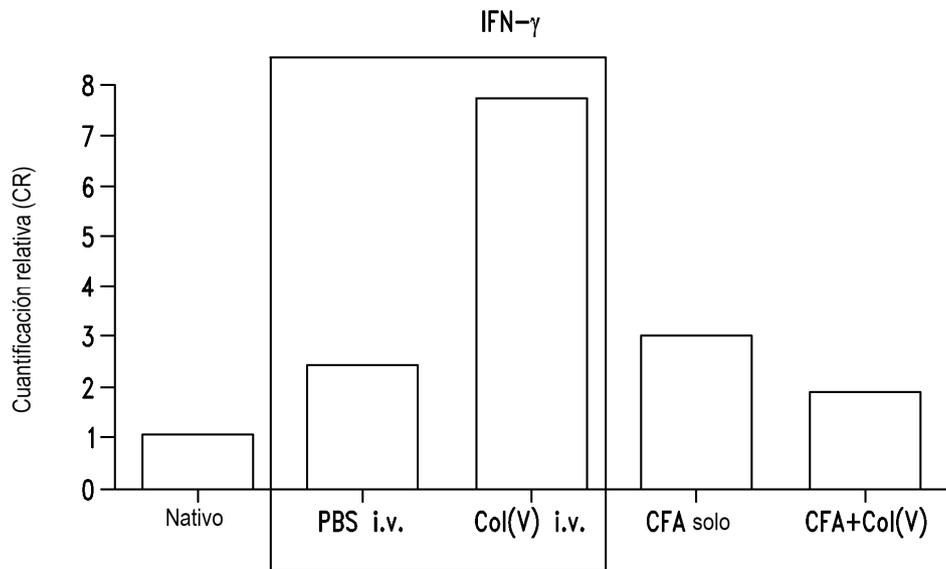


*FIG. 4B*

Niveles de transcripciones de células mononucleares pulmonares

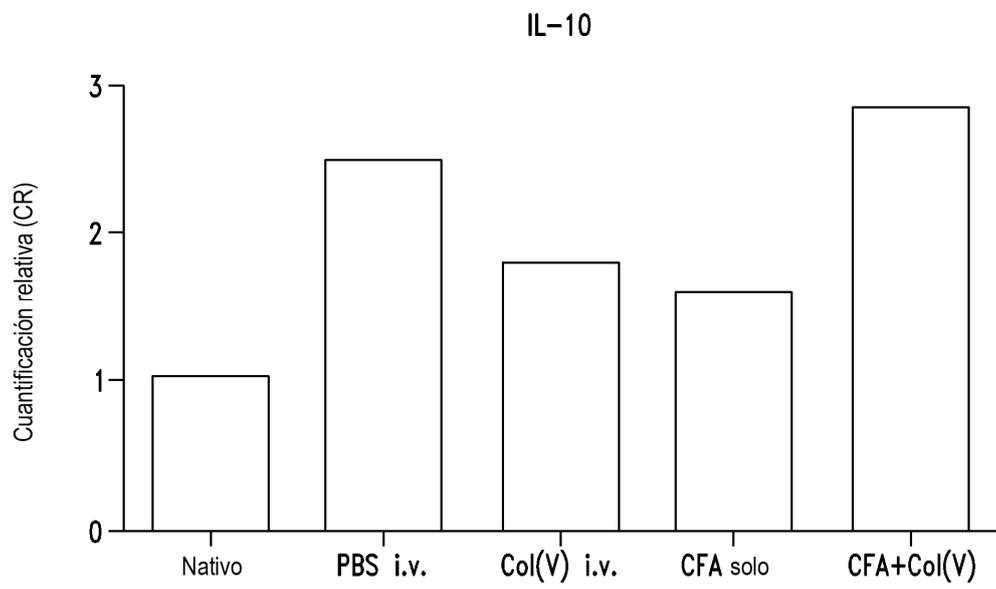


*FIG. 4C*



*FIG. 4D*

Niveles de transcripciones de células mononucleares pulmonares



*FIG. 4E*