

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 941**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2012** **PCT/JP2012/058912**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012** **WO12141026**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2012** **E 12770896 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017** **EP 2698386**

54 Título: **Proteína de fusión**

30 Prioridad:

13.04.2011 JP 2011088762

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2018

73 Titular/es:

NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
8-1, Akashi-cho,
Chuo-ku, Tokyo 104-0044, JP

72 Inventor/es:

KOGURE, TAKAHISA;
NAKAJIMA, KENJI y
HOMMA, MASAYUKI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 655 941 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

Proteína de fusión

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a una proteína de fusión que puede prevenir y tratar eficazmente una enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo tal como miastenia grave neutralizando autoanticuerpos e inhibiendo la producción de autoanticuerpos. Más particularmente, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que tiene una potente función necesaria y suficiente para la prevención y el tratamiento y que se secreta también al exterior de las células como resultado de la expresión, al mismo tiempo que mantiene su estructura estable con lo que es capaz de hacer frente incluso a la producción industrial.

10 Antecedentes de la técnica

El sistema inmunitario tiene inherentemente el papel de reconocer y eliminar un cuerpo extraño tal como una bacteria o virus que es diferente de los propios pero, a veces, reacciona excesivamente con las células y tejidos normales propios y los ataca debido a una anomalía congénita o adquirida. Enfermedad autoinmunitaria es un nombre genérico para las enfermedades resultantes de tal estado. Entre ellas, una enfermedad causada por la
15 reacción de autoanticuerpos (anticuerpos que reconocen células y tejidos propios como antígenos) con autoantígenos (las células y tejidos propios) se denomina "enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo". Los ejemplos de enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo incluyen miastenia grave, anemia hemolítica de tipo autoinmunitario, púrpura trombocitopénica idiopática, neutropenia de tipo autoinmunitario, hipertiroidismo o enfermedad de Hashimoto causada por anticuerpo anti-TSH, encefalitis aguda de tipo autoanticuerpo y encefalitis
20 marginal no herpética.

Como método de tratamiento para la enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo, se ha realizado frecuentemente la administración de agentes esteroideos o inmunosupresores. Sin embargo, cualquiera de esos fármacos no suprime específicamente los autoanticuerpos que son la causa fundamental de la enfermedad, sino que suprime en general la inmunorreacción en conjunto. Por lo tanto, los fármacos no tienen especificidad y los métodos
25 no son un método de tratamiento suficientemente eficaz en términos de CDV (calidad de vida).

Con respecto a la miastenia grave, que es uno de los ejemplos representativos de las enfermedades autoinmunitarias de tipo autoanticuerpo, no hay agentes de tratamiento ya conocidos para el tratamiento fundamental de la misma tampoco, sino que simplemente se han usado principalmente los agentes esteroideos anteriores, los inmunosupresores anteriores, inhibidores de colinesterasa, terapia de intercambio de plasma,
30 preparaciones de inmunoglobulina para inyección intravenosa y timectomía (véanse el documento no de patente 1 documento no de patente 2, documento no de patente 3 y documento no de patente 4).

Entre los anteriores, el uso de inhibidores de colinesterasa es difícil por su ajuste de dosis. También, a veces puede ser necesario inyectar sulfato de atropina por vía intravenosa o asegurar las vías aéreas teniendo en cuenta el caso de efectos secundarios. Además, cuando se administra una dosis alta durante un periodo largo, se rebaja su efecto
35 y, en algunos casos, pueden suceder crisis colinérgicas que se consideran problemáticas. Este agente no se pretende para tratamiento terapéutico, sino que es un simple tratamiento sintomático. Fundamentalmente, se va a usar la dosis mínima mediante la que se consigue el efecto y se va a evitar una administración a largo plazo si fuera posible.

Con respecto a los agentes esteroideos, sus efectos secundarios se consideran problemáticos y el control de los efectos secundarios es muy importante. Además, una administración continuada de tales agentes durante un periodo largo es difícil y es necesario controlar junto con el uso de inmunosupresores no esteroideos tales como tacrolímús o ciclosporina. Sin embargo, como se menciona anteriormente, los agentes anteriores son simplemente
40 para tratamiento sintomático y no son medios terapéuticos fundamentales.

Con respecto a la timectomía, aunque muestra cierto efecto, existen problemas de ansiedad en pacientes ante la operación de extirpación y también de costes. Existe otro problema, que no es aplicable a niños pequeños cuya función inmunitaria no está aún desarrollada y a pacientes que padecen enfermedad de inmunodeficiencia. Además, aunque exhibe algunos efectos, se requieren muchos años, hasta decenios, hasta que se confirma el efecto. Es inevitable realizar conjuntamente otros tratamientos sintomáticos hasta reconocer el efecto. Existe aún otro problema, que el efecto se confirmaba en solo menos de un 50 % de los pacientes.
45

Con respecto a la terapia de intercambio de plasma, se necesita un coste de no menos de un millón de yenes para un tratamiento. El subsidio para los gastos médicos de miastenia grave según el sistema de Combinación de procedimiento de diagnóstico es solo de aproximadamente 600.000 yenes, con lo que la carga en el sitio de asistencia médica es alta. Además, existe el problema de que la duración del efecto de la misma es tan corta como solo aproximadamente un mes.
50

Como método de tratamiento para miastenia grave, se ha confirmado en los últimos años la eficacia de las preparaciones de gammaglobulina y algunos fabricantes farmacéuticos están realizando ahora pruebas clínicas para
55

ellas. Sin embargo, puesto que las preparaciones de gammaglobulina son preparaciones biológicas derivadas de plasma humano, puede existir el riesgo de infección debida a virus desconocidos, etc. Además, la dosis de las preparaciones de gammaglobulina es alta (400 mg/kg, administración continuada durante 5 días) y se espera que las cargas para pacientes y sitios de asistencia médica sean considerablemente altas. Por otro lado, se ha indicado que la duración del efecto de las mismas es el mismo que la terapia de intercambio de plasma o simplemente un poco mayor.

Para resumir, el problema en el tratamiento de la miastenia grave es que, en cuanto al tratamiento que usa fármacos de bajo peso molecular, es un simple tratamiento sintomático temporal, y en cuanto a la terapia de intercambio de plasma, preparaciones de gammaglobulina y timectomía, los problemas en términos de efecto y costes permanecen todavía también.

Podría conseguirse un reconocimiento y eliminación in vitro selectivos de linfocitos B reactivos con el receptor nicotínico de acetilcolina mediante una proteína de fusión recombinante compuesta por el dominio extracelular humano de la subunidad $\alpha 1$ de AChR y el dominio Fc de la cadena pesada de IgG1 humana (véase el documento no de patente 5).

En vista de los problemas anteriores, los presentes inventores pensaron que se esperaría un efecto eficaz con una dosis pequeña que no cause cargas a los pacientes si pudiera prepararse en proteína recombinante un anticuerpo que reaccione solo con autoanticuerpos anti-receptor de acetilcolina, que se cree que son la causa de la miastenia grave. Entonces, los presentes inventores prepararon la proteína de fusión de la región extracelular N-terminal de la subunidad nAChR $\alpha 1$ con la región constante de cadena pesada de anticuerpo como sustituto del anticuerpo antiidiotípico para neutralizar los autoanticuerpos anti-receptor de acetilcolina. Puesto que esta proteína de fusión tiene la actividad de neutralizar los autoanticuerpos y también de dañar las células de producción de autoanticuerpos, se ha juzgado que es muy eficaz para miastenia grave, que es una de las enfermedades autoinmunitarias de tipo autoanticuerpo. Sin embargo, esta proteína de fusión tenía una baja cantidad de expresión y su producción industrial estaba en situación difícil (véase el documento de patente 1).

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: patente japonesa nº 4495776.

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: "Trends of clinical test studies for myasthenia gravis", *Nippon Rinsho*, vol. 66, nº. 6, pág. 1155-1157.

Documento no de patente 2: "High-dose therapy by immunoglobulin", *Shinkei Chiryō*, vol. 25, nº 6, pág. 689-692.

Documento no de patente 3: "Guideline for the Treatment of Myasthenia gravis (MG)", Report of 1995 by the Search and Study Team for Special Diseases and Immunological Neural Diseases, Health and Welfare Ministry.

Documento no de patente 4: "Current Status of Treatment and Prognosis of Myasthenia Gravis in Japan", Memorial Lecture at the Fourth MG Forum.

Documento no de patente 5: "Selective recognition and elimination of nicotinic acetylcholine receptor-reactive B cells by a recombinant fusion protein AChR-Fc in myasthenia gravis in vitro", *Journal of Neuroimmunology* 227 (2010) 35-43.

Divulgación de la invención

Problema que va a resolver la invención

La presente invención se ha creado en vista del estado actual de la técnica anterior como tal y es un objeto de la presente invención proporcionar una nueva proteína de fusión que pueda suprimir específicamente autoanticuerpos, que pueda prevenir o tratar eficazmente la enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo y que pueda expresarse en una cantidad suficiente para la producción industrial. Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para fabricar la proteína de fusión.

Medios para resolver el problema

Puede esperarse el efecto de la proteína de fusión anterior en el documento de patente 1 como agente de tratamiento para miastenia grave por dos puntos, que son la inhibición de la producción de autoanticuerpos y la neutralización de los autoanticuerpos producidos. Sin embargo, en la proteína de fusión de proteína receptora con región constante de cadena pesada de anticuerpo, son problemas la pequeña cantidad de expresión que parece causada por el impedimento estérico de la estructura, la pureza de la proteína expresada, etc.

Bajo tales circunstancias, los presentes inventores han realizado diversas investigaciones para potenciar la cantidad expresada de proteína de fusión y la pureza de la proteína expresada y han señalado que, en la proteína de fusión del documento de patente 1, cada una de la proteína receptora y la región constante de cadena pesada de anticuerpo está en una estructura complicada con lo que, debido a su impedimento estérico, se da como resultado un enlace disulfuro incorrecto durante la expresión de la proteína de fusión y, como resultado, no se consiguen una pureza y cantidad expresada suficientes. Como medio para resolver lo anterior, los presentes inventores han ideado una proteína de fusión en la que se inserta un péptido ligador flexible entre la proteína receptora y la región constante de cadena pesada de anticuerpo. Por tanto, los presentes inventores pensaron que cada una de las estructuras de proteína receptora y región constante de cadena pesada de anticuerpo mantendría la estructura estable inherente mediante la inserción del péptido ligador flexible. Los presentes inventores pensaron entonces que, como resultado de la formación de una estructura estable en cada región, se promovería un efecto secretor al exterior de las células dando como resultado mucha más producción de proteína de fusión y, además, se potenciaría la estabilidad de la proteína de fusión misma, con lo que la proporción de producto descompuesto puede volverse significativamente pequeña y ser ahora posible una mejora de la pureza. En vista de lo anterior, los presentes inventores han preparado una proteína de fusión en que se inserta este péptido ligador flexible y han encontrado que, en esta proteína de fusión, se potencia en gran medida la cantidad expresada y la pureza de la proteína expresada mejora significativamente también en comparación con la proteína fusionada convencional que no tiene péptido ligador. Los presentes inventores han encontrado también que, en la proteína de fusión en que se inserta un péptido ligador flexible, se potencia significativamente el efecto neutralizante de autoanticuerpos y el efecto de supresión específica de las células productoras de autoanticuerpos es también fuerte en comparación con la proteína fusionada convencional que no tiene péptido ligador. Los presentes inventores han encontrado también que se consigue una más fuerte citotoxicidad celular cuando la región constante de cadena pesada de anticuerpo (A) está situada en el lado C-terminal que en el lado N-terminal. Los presentes inventores han conseguido la presente invención basándose en estos hallazgos.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona una proteína de fusión caracterizada porque se conecta una proteína (X), que contiene un sitio reconocido por autoanticuerpos que son la causa de la enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo, con una proteína (A), que contiene un fragmento de la región constante de cadena pesada de anticuerpo que exhibe citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, y con un péptido ligador (L), consistente en uno o más aminoácidos, en la que la proteína (X), el péptido ligador (L) y la proteína (A) están conectados en este orden mediante un enlace peptídico de extremo N a extremo C, y en la que la proteína de fusión consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID N° 10 o 15.

Además, de acuerdo con la presente invención, se proporciona también un método para fabricar la proteína de fusión anterior que se caracteriza porque se inserta el ADN que codifica la proteína de fusión anterior en un vector de expresión celular y se introduce este vector en células hospedadoras para expresar la proteína de fusión. Se proporciona además una composición para la prevención y el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo que se caracteriza por contener la proteína de fusión anterior como ingrediente eficaz.

Ventajas de la invención

La proteína de fusión de la presente invención neutraliza los autoanticuerpos existentes en el cuerpo de un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo e inhibe también la producción de autoanticuerpos, con lo que puede suprimir específicamente los autoanticuerpos. Además, la proteína de fusión de la presente invención tiene una alta cantidad de expresión y pureza y puede proporcionarse como un fármaco a escala de producción real. Por consiguiente, cuando se usa la proteína de fusión de la presente invención, es ahora posible prevenir y tratar eficazmente diversas enfermedades autoinmunitarias de tipo autoanticuerpo tales como miastenia grave.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de la región para expresar una proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc preparada en los Ejemplos.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático de la región para expresar una proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc preparada en los Ejemplos.

La Fig. 3 es un diagrama esquemático de la región para expresar una proteína de fusión $\alpha 1$ -L2-Fc preparada en los Ejemplos.

La Fig. 4 es un diagrama esquemático de la región para expresar una proteína de fusión Fc-L2- $\alpha 1$ preparada en los Ejemplos.

La Fig. 5 muestra una imagen teñida con plata (lado izquierdo) y una imagen de transferencia Western (lado derecho) después de PAGE-SDS de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc en estado reducido purificada después de expresión transitoria.

La Fig. 6 muestra la capacidad de unión de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc con la proteína A y α -bungarotoxina. ♦ muestra el resultado de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y ▲ muestra el resultado de la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc.

5 La Fig. 7 muestra la capacidad de unión de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc con autoanticuerpos anti-subunidad nAChR $\alpha 1$. ♦ muestra el resultado de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y ▲ muestra el resultado de la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc.

La Fig. 8A muestra la unión de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc con células Mab35 de hibridoma. Se muestra la concentración añadida de proteína de fusión en la Fig. 8A.

10 La Fig. 8B muestra la unión de la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc con células Mab35 de hibridoma. Se muestra la concentración añadida de proteína de fusión en la Fig. 8B.

La Fig. 9 muestra la actividad inhibidora de la unión de 100 μ g/ml de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc (lado izquierdo) y la actividad inhibidora de la unión de la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc a la misma concentración (lado derecho) sobre la unión de 1 μ g/ml de autoanticuerpo mAb35 con células TE671.

15 La Fig. 10 muestra el efecto mejorador de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc sobre los síntomas de tipo miastenia grave inducidos por el autoanticuerpo mAb35. La abscisa muestra el tiempo y la ordenada muestra la puntuación de síntomas de tipo miastenia grave. ● muestra un grupo administrado con solución salina fisiológica, ♦ muestra un grupo administrado con una preparación de globulina para inyección intravenosa, Δ y ▲ muestran cada uno un grupo administrado con la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y □ y ■ muestran cada uno un grupo administrado con la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc.

20 Modo para llevar a cabo la invención

La proteína de fusión de la presente invención tiene una estructura en la que la proteína (X), que contiene un sitio reconocido por autoanticuerpos que son la causa de la enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo, está conectada con una proteína (A), que contiene un fragmento que exhibe la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo de la región constante de cadena pesada de anticuerpo, y con un péptido ligador (L) consistente en uno o más aminoácidos.

25 La proteína (X) corresponde a un autoantígeno de autoanticuerpos o una parte del mismo y desempeña un papel como señuelo de unión a autoanticuerpos como sustituto del autoantígeno de un paciente. Por tanto, cuando se administra la proteína de fusión de la presente invención a un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo, los autoanticuerpos en el cuerpo de paciente reconocen la parte de la proteína (X) en la proteína de fusión como autoantígeno y se unen a esta parte. Puesto que los autoanticuerpos unidos no pueden unirse ya al autoantígeno que está presente inherentemente en el cuerpo del paciente, pueden neutralizarse los autoanticuerpos mediante este método y puede suprimirse la generación de síntomas de la enfermedad autoinmunitaria por unión de los autoanticuerpos al autoantígeno del paciente. Aunque los autoanticuerpos no son un anticuerpo específico, sino que están compuestos por un grupo de diversos anticuerpos, cualquiera de los anticuerpos es común en el sentido de que tiene la función de reconocer el autoantígeno. Por consiguiente, cuando se usa la proteína de fusión de la presente invención, que actúa como señuelo de autoantígeno, una proteína de fusión puede neutralizar un grupo de diversos anticuerpos, y por tanto no hay necesidad de preparar separadamente cada proteína de fusión para cada uno de los diversos anticuerpos.

40 “Anticuerpo” definido aquí representa todos los anticuerpos de cada clase IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y cada subclase de los mismos. “Región constante de anticuerpo” representa anticuerpo de cada clase o anticuerpo de cada subclase y/o una combinación de región constante de cadena pesada de anticuerpo del mismo también. No existe una limitación particular para la estructura de cadena de azúcar que se añade a la región constante de cadena pesada de anticuerpo.

45 La proteína de fusión de la presente invención contiene una proteína (A) que contiene un fragmento de la región constante de cadena pesada de anticuerpo, además de una proteína (X) que actúa como señuelo para autoantígeno. Esta proteína (A) desempeña también un papel de exhibición de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (actividad ADCC). Los autoanticuerpos se producen por linfocitos B en la sangre. Existen anticuerpos de tipo presentación en superficie celular que tienen el mismo sitio de unión de antígeno que los autoanticuerpos sobre la superficie de linfocitos B como receptores de linfocitos B. Por consiguiente, cuando se administra la proteína de fusión de la presente invención a un paciente, una parte de la proteína de fusión se une a los autoanticuerpos del cuerpo del paciente como se menciona anteriormente, mientras que el resto se une a los anticuerpos sobre la superficie de linfocitos B (receptor de linfocitos B) que producen los autoanticuerpos. Cuando la proteína de fusión de la presente invención se une al receptor de linfocitos B, las células efectoras tales como linfocitos NK se unen a una proteína (A) en la proteína de fusión a través de un receptor Fc de las células efectoras, que exhibe citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (actividad ADCC), dañan la unión de linfocitos B a la proteína de fusión y suprimen la producción de autoanticuerpos. Como tal, de acuerdo con la presente invención, el resultado no es solo que los autoanticuerpos existentes en el cuerpo se neutralicen para inhibir la unión de los autoanticuerpos al

autoantígeno, sino que también los linfocitos B específicos que son una fuente de producción de autoanticuerpos pueden dañarse selectivamente. Por consiguiente, la proteína de fusión de la presente invención puede prevenir o tratar la enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo de dos modos, que son la inhibición de la producción de autoanticuerpos y la neutralización de los autoanticuerpos producidos.

- 5 La proteína de fusión de la presente invención incluye un péptido ligador flexible (L) consistente en uno o más aminoácidos. Como resultado de la inserción de tal péptido ligador, la estructura de cada una de la proteína receptora y la región constante de cadena pesada de anticuerpo se vuelve una estructura estable, con lo que la proteína de fusión se vuelve estable en conjunto.

- 10 La presente invención se caracteriza porque la proteína receptora (X), el péptido ligador (L) y la región constante de cadena pesada de anticuerpo (A) se secuencian en el orden (X)-(L)-(A) de extremo N a extremo C. Teóricamente, la región constante de cadena pesada de anticuerpo (A) está situada en cualquier lado del lado N-terminal y el lado C-terminal, pero los presentes inventores han encontrado que la región constante de cadena pesada de anticuerpo (A) debería estar situada en el lado C-terminal, en el que el impedimento estérico es bajo para unión a un receptor, con el fin de lograr eficazmente la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (actividad ADCC) de la región constante de cadena pesada de anticuerpo (A). Se supone también que, cuando la proteína receptora (X) está situada en el extremo N, puede conseguirse también un fuerte efecto como señuelo.

- La proteína (X) en la proteína de fusión de la presente invención corresponde a un autoantígeno, o una parte del mismo, de autoanticuerpos que son la causa de la enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo para prevenir o tratar en el paciente. La proteína (X) se decide dependiendo de la enfermedad autoinmunitaria para prevenir o tratar en el paciente. Por ejemplo, en el caso de prevención y tratamiento de miastenia grave, puesto que la miastenia grave es una enfermedad resultante de una causa tal como la unión de anticuerpos anti-receptor nicotínico de acetilcolina (autoanticuerpos), en la unión nervio-músculo, con un receptor nicotínico de acetilcolina (autoantígeno), que es un receptor en el lado del músculo del neurotransmisor acetilcolina con el que se inhibe la transmisión nerviosa/muscular de acetilcolina, la proteína (X) puede ser un receptor nicotínico de acetilcolina que es el autoantígeno. De forma similar, en el caso de prevención y tratamiento de anemia hemolítica de tipo autoinmunitario, la proteína (X) puede ser un marcador de superficie eritrocítica; en el caso de prevención y tratamiento de púrpura trombocitopénica idiopática, la proteína (X) puede ser un marcador de superficie de plaquetas; en el caso de prevención y tratamiento de neutropenia de tipo autoinmunitario, la proteína (X) puede ser un marcador de superficie neutrofílica; en el caso de prevención y tratamiento de hipertiroidismo o hipotiroidismo primario (enfermedad de Hashimoto) causado por anticuerpo anti-TSH, la proteína (X) puede ser TSH y en el caso de prevención o tratamiento de encefalitis y encefalopatía de tipo autoanticuerpo, la proteína (X) puede ser un receptor de NMDA, receptor de AMPA, etc.

- No es necesario que la proteína (X) sea el receptor completo o el marcador completo, sino que puede ser una parte del mismo siempre que esté contenido en el mismo un sitio de reconocimiento de autoanticuerpos. Por ejemplo, en el caso de miastenia grave, el receptor nicotínico de acetilcolina anterior es una proteína pentamérica consistente en cuatro clases de subunidades y, entre ellas, el sitio de reconocimiento de los autoanticuerpos existe en la región extracelular N-terminal de isoforma 1 (una isoforma expresada solo en músculo esquelético y mostrada por la SEQ ID N° 13) e isoforma 2 (una isoforma expresada en músculo esquelético, cerebro, corazón, riñón y pulmón y mostrada por la SEQ ID N° 14) de una subunidad $\alpha 1$. Por consiguiente, en el caso de miastenia grave, la proteína (X) puede ser una subunidad $\alpha 1$ de receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR $\alpha 1$) o una parte de la misma. Para ser más específico, puede ser la isoforma 1 y/o isoforma 2 de la subunidad nAChR $\alpha 1$ o una parte de la misma, y para ser aún más específico, puede consistir en la secuencia aminoacídica de la región extracelular N-terminal de la isoforma 1 y/o isoforma 2 de la subunidad nAChR $\alpha 1$.

- En las secuencias aminoacídicas como tales, pueden eliminarse uno o varios (tal como 1 a 20, preferiblemente 1 a 10 y más preferiblemente 1 a 7) aminoácidos, añadirse o sustituirse siempre que no se perjudique la homología de los mismos. Con respecto al intervalo de las mismas, es un ejemplo una secuencia aminoacídica que tiene un 70 % o más, preferiblemente un 80 % o más y más preferiblemente un 90 % o más de identidad de secuencia. La homología de la secuencia aminoacídica puede calcularse usando el algoritmo de cálculo de homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) en condiciones tales que el valor esperado sea 0, se permita hueco, la matriz sea BLOSUM 62 y se desconecte el filtrado. Para ser más específico, la secuencia aminoacídica en la que se introducen delección, adición y/o sustitución como tal puede prepararse fácilmente sustituyendo la correspondiente secuencia de ADN usando un kit comercialmente disponible tal como el kit de mutagénesis dirigida a sitio (fabricado por Takara Bio Inc.) o el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange (fabricado por STRATAGENE). También es posible preparar directamente la secuencia aminoacídica anterior mediante una técnica de síntesis génica artificial.

- La proteína (A) en la proteína de fusión de la presente invención es una proteína que contiene un fragmento de una región constante de cadena pesada de anticuerpo y puede ser, por ejemplo, una región Fc de la cadena pesada de anticuerpo, la región constante de la cadena pesada de anticuerpo o una parte de la misma. "Anticuerpo" incluye todas las clases de IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e incluye también todas las subclases de las mismas. "Región constante de cadena pesada de anticuerpo" es una parte que excluye la región variable de la cadena pesada de anticuerpo. Por ejemplo, cuando la clase es IgG, la región constante de la cadena pesada de anticuerpo comprende una

combinación de región CH1, región de bisagra, región CH2 y región CH3. La región constante de cadena pesada de anticuerpo puede ser también una combinación de cada clase o cada subclase anterior o una región constante de cadena pesada de la misma. Por ejemplo, cuando la clase es IgG, la región Fc de la cadena pesada de anticuerpo comprende una combinación de región de bisagra, región CH2 y región CH3. En el caso de IgG1 de anticuerpo humano, puede ejemplificarse específicamente la secuencia aminoacídica de SEQ ID N° 11 o SEQ ID N° 12. Tanto la SEQ ID N° 11 como la n° 12 son secuencias de la región Fc de IgG1 de anticuerpo humano. La SEQ ID N° 11 se dice que es un tipo encontrado abundantemente en personas asiáticas, mientras que la SEQ ID N° 12 se dice que es un tipo encontrado abundantemente en personas europeas y americanas.

El ligador peptídico (L) en la proteína de fusión de la presente invención consiste en uno o más aminoácidos, preferiblemente 5 a 45, más preferiblemente 10 a 20, y lo más preferiblemente 16 aminoácidos. Este ligador peptídico puede contener el elemento Gly-Ser o Ser-Gly.

Los ejemplos específicos de ligador peptídico (L) incluyen que el contiene una secuencia aminoacídica representada por

la fórmula (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n,

la fórmula Pro-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n,

la fórmula Gly-Ser(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n,

la fórmula (Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)_n o

la fórmula (Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)_n-Ser-Pro

(en las fórmulas, n es un entero de 1 a 8).

Entre las anteriores, se prefieren las secuencias aminoacídicas representadas por la primera y segunda fórmulas. El número de repetición (n) en las fórmulas es preferiblemente un entero de 1 a 4 y, más preferiblemente, 3.

Otros ejemplos específicos de ligador peptídico (L) incluyen los ligadores peptídicos que contienen una secuencia que tiene una estructura basada en el aminoácido Gly y/o el aminoácido Ser (tal como el que contiene una secuencia que tiene Gly-Gly-Ser-Ser-Arg-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser-Ser-Arg-Ser-Ser-Ser-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly o Glu-Phe-Gly-Gly-Gly-Gly).

Aún otros ejemplos específicos de ligador peptídico (L) incluyen aquellos que tienen las siguientes secuencias aminoacídicas o que contienen secuencias aminoacídicas en las que se aplican mejoras basadas en esas secuencias.

A) Asp-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Asp-Ala-Ala-Ala-Arg-Glu-Ala-Ala-Ala-Arg-Asp-Ala-Ala-Ala-Lys

B) Asn-Val-Asp-His-Lys-Pro-Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Arg

Es un ejemplo específico de proteína de fusión de la presente invención una proteína consistente en la secuencia aminoacídica de SEQ ID N° 10. Esta proteína de fusión tiene una estructura en la que la proteína (X), el péptido ligador (L) y la proteína (A) están conectados en este orden mediante un enlace peptídico de extremo N a extremo C. La proteína (X) corresponde a una secuencia aminoacídica consistente en los aminoácidos en posiciones 1 a 210 de la secuencia aminoacídica de la región extracelular N-terminal de la isoforma 1 de la subunidad nAChR α 1. El péptido ligador (L) corresponde a Pro-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃. La proteína (A) corresponde a la secuencia aminoacídica de SEQ ID N° 11.

La proteína de fusión de la presente invención puede fabricarse según técnicas de genomanipulación conocidas públicamente convencionales. Por tanto, por ejemplo, se amplifica si es necesario cada uno del ADN que codifica la proteína (X), el ADN que codifica el péptido ligador (L) y el ADN que codifica la proteína (A), se unen entre sí esos ADN, se inserta el ADN resultante en un vector de expresión celular y se transfecta una célula hospedadora con el vector para expresar la proteína de fusión, con lo que puede fabricarse la proteína de fusión de la presente invención. La amplificación del ADN puede realizarse, por ejemplo, mediante un método de PCR. La unión del ADN amplificado puede realizarse, por ejemplo, mediante un método de PCR de extensión por superposición. También es posible diseñar una secuencia aminoacídica de proteína de fusión para expresar de modo que se prepare directamente un gen sintético artificial. Se prefiere que el vector de expresión incluya un promotor tal como CMV o SV40 para potenciar la eficacia de expresión y una secuencia señal de secreción tal como la secuencia señal de la cadena pesada de anticuerpo o la secuencia señal de la cadena κ de anticuerpo para una fácil recuperación de la proteína de fusión expresada a partir del sobrenadante de cultivo. Se prefiere también insertar la secuencia Kozak en dirección 5' del codón de inicio de la transcripción para potenciar la cantidad de proteína expresada. En el caso de la presente proteína de fusión, la subunidad nAChR α 1, que es una proteína de membrana, existe en el lado N-terminal y, además, la presente proteína de membrana tiene una región extracelular en el lado N-terminal y, por consiguiente, la compatibilidad de la proteína expresada y la secuencia señal es buena, dando como resultado una

buena expresión de secreción cuando se usa una secuencia señal original de la subunidad nAChR α 1. En cuanto a la célula hospedadora de expresión, pueden usarse células de mamífero, levadura, células animales, células de insecto, células vegetales, células bacterianas (*Escherichia coli*, etc.), etc. Entre ellas, se prefieren las células animales y se prefieren particularmente células CHO, células HEK293, etc. Además, cuando se infunde una secuencia de ácido nucleico que expresa la proteína de fusión en cromosomas, es también posible la expresión como animal transgénico. La proteína de fusión expresada puede recuperarse mediante medios convencionales y puede purificarse, por ejemplo, mediante un método de columna de proteína A.

Se harán ahora ilustraciones de la composición para la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias de tipo autoanticuerpo caracterizada por comprender la proteína de fusión de la presente invención como ingrediente eficaz. Los ejemplos de forma de preparación específica de tal composición son inyección y absorción mucosa. En el caso de inyección, se añaden un estabilizante tal como un sacárido, poliol, albúmina o tensioactivo, un agente isotonicante tal como sal, etc. a la proteína de fusión anteriormente preparada de la presente invención, se liofiliza el producto resultante para conservación y se administra disolviendo en agua para inyecciones para el uso. Aunque no hay una limitación particular para el contenido de la proteína de fusión de la presente invención en el producto liofilizado, es de 0,01 a 200 mg/g y preferiblemente de 0,1 a 100 mg/g, por ejemplo. Aunque no hay una limitación particular para el contenido de la proteína de fusión en la inyección disuelta, es de 0,01 a 200 mg/ml y preferiblemente de 0,1 a 100 mg/ml, por ejemplo. Los ejemplos de método de administración en el caso de inyección incluyen administración intravenosa, administración intramuscular y administración subcutánea. En el caso de absorción mucosa, se pone la proteína de fusión de la presente invención en una forma de dosificación junto con, por ejemplo, excipientes y estabilizantes, para dar una preparación de absorción mucosa de liberación mantenida, y puede administrarse a través de la mucosa oral, mucosa nasal, párpado, etc. Aunque no hay una limitación particular para el contenido de la proteína de fusión de la presente invención en la absorción mucosa, es de 0,1 a 300 mg/ml y preferiblemente de 0,5 a 100 mg/ml, por ejemplo. La dosis de la composición de la presente invención varía dependiendo del efecto terapéutico pretendido, el método de administración, el periodo terapéutico, la edad, peso corporal, etc. y es habitualmente de 10 μ g/kg a 50 mg/kg al día para un adulto.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora con más detalle a continuación por los Ejemplos, pero la presente invención no está limitada a estos Ejemplos.

(1) Construcción de un vector de expresión de la proteína de fusión α 1-Fc (ejemplo comparativo)

Se extrajo la secuencia de la secuencia señal y la región extracelular N-terminal de la subunidad nAChR α 1 basándose en la información de la secuencia proteica de isoforma 1 (nº de acceso: P02708-2) de la subunidad α 1 de receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) ya conocida. Se extrajo también la secuencia de la región Fc basándose en la información de la secuencia proteica (nº de acceso P01857) de la región constante de IgG1 de anticuerpo humano. Después de eso, se diseñó una secuencia proteica de 462 residuos en la que se fusionaban ambas secuencias.

Para realizar la expresión de la proteína fusión usando células de ovario de hámster chino (células CHO), se realizó la optimización de una secuencia de ácido nucleico adecuada para células CHO y se preparó una secuencia de ácido nucleico en la que se añadieron una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción y una secuencia Kozak al lado 5', mientras que se añadieron un codón de terminación y una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción al lado 3' mediante una técnica sintética génica artificial (SEQ ID Nº 1).

Se trató el gen sintético artificial resultante con enzima de restricción y se insertó bajo el dominio del promotor hCMV-MIE de pEE12. 4, que era un vector de expresión para células animales, para construir un vector pEE12.4-A1Fc para secreción y expresión de la proteína de fusión α 1-Fc (SEQ ID Nº 2), que comprende la región extracelular N-terminal de la isoforma 1 de la subunidad nAChR α 1 humana y la región Fc de cadena pesada de IgG1 de anticuerpo humano. Se muestra en la Fig. 1 el esquema de la región de expresión de proteína.

(2) Construcción del vector de expresión de una proteína de fusión α 1-L-Fc (ejemplo de la presente invención)

Se realizó la amplificación de ácido nucleico para la región de la subunidad nAChR α 1 que contiene la secuencia Kozak de SEQ ID Nº 1 mediante el método de PCR, usando el gen sintético artificial preparado en (1) como molde; usando el cebador de SEQ ID Nº 3 y un cebador de SEQ ID Nº 4, a los que se añadieron una secuencia de ácido nucleico que codifica un ligador flexible (L) (Pro-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃) como conjunto de cebadores; y usando "KOD-Plus-Neo" (nº de catálogo: KOD-401) de Toyobo como ADN polimerasa, con lo cual se preparó una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID Nº 5.

Por otro lado, se realizó la amplificación de ácido nucleico de la región Fc de IgG1 de anticuerpo mediante el método de PCR usando el gen sintético artificial de SEQ ID Nº 1 como molde; usando un cebador de SEQ ID Nº 6 al que se añadió una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de ligador flexible y un cebador de SEQ ID Nº 7 como conjunto de cebadores; y usando KOD-Plus-Neo de Toyobo como ADN polimerasa, con lo cual se preparó

una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N° 8.

Se realizó la amplificación de ácido nucleico mediante el método de PCR de extensión por superposición usando soluciones mixtas de SEQ ID N° 5 y SEQ ID N° 8 como molde, usando un cebador de SEQ ID N° 3 y un cebador de SEQ ID N° 7 como conjunto de cebadores; y usando KOD-Plus-Neo de Toyobo como ADN polimerasa, con lo cual se preparó una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N° 9.

Se trató el producto amplificado resultante de ácido nucleico con enzima de restricción y se insertó bajo el dominio del promotor hCMV-MIE de pEE12. 4, que era un vector de expresión para células animales, para construir un vector pEE12. 4-A1LFC para secreción y expresión de la proteína de fusión α 1-L-Fc (SEQ ID N° 10), en la que la región extracelular N-terminal de la isoforma 1 de la subunidad nAChR α 1 humana y la región Fc de cadena pesada de IgG1 de anticuerpo humano estaban conectadas por una secuencia de ligador flexible (L). Se muestra un esquema de la región de expresión de proteína en la Fig. 2.

(3) Confirmación de la expresión transitoria de la proteína de fusión α 1-Fc y una proteína de fusión α 1-L-Fc

Se transfectaron células HEK293 con los vectores de expresión de la proteína de fusión pEE12.4-A1Fc y pEE12.4-A1LFC preparados en (1) y (2) usando el sistema de expresión "Free Style MAX 293 Expression System" (n° de catálogo: K9000-10) de Invitrogen para expresar la proteína de fusión α 1-Fc y la proteína de fusión α 1-L-Fc. Se purificaron entonces usando una columna de purificación "HiTrap Protein A HP Column" (n° de catálogo: 17-0402-01) de GE Health Care, dando la proteína de fusión α 1-Fc y la proteína de fusión α 1-L-Fc.

Se realizó la confirmación de la expresión de cada una de las proteínas de fusión mediante tinción con plata y transferencia Western después de PAGE-SDS. Para la transferencia Western, se usó un anticuerpo de IgG antihumano marcado con HRP. Se muestra el resultado en la Fig. 5. La banda mostrada por una flecha en la Fig. 5 corresponde a la proteína de fusión. A partir de este resultado, se confirmó que, cuando se insertaba un ligador flexible (L), aumentaba significativamente la cantidad expresada de proteína de fusión.

(4) Construcción del vector de expresión de la proteína de fusión α 1-L2-Fc (ejemplo de la presente invención).

Se preparó un vector para expresar una proteína de fusión α 1-L2-Fc (SEQ ID N° 15) en el que se modificó un ligador flexible (L) (Pro-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)3) de α 1-L-Fc preparado en (2) a un ligador flexible (L2) ((Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)3).

Se realizó la preparación de la secuencia génica que codifica la proteína de fusión (SEQ ID N° 18) mediante el mismo método de PCR, en el que se usó un gen sintético artificial (SEQ ID N° 1) como molde y se sustituyeron los cebadores de SEQ ID N° 4 y 6 de (2) por las SEQ ID N° 16 y 17.

Se trató el producto amplificado de ácido nucleico resultante con enzima de restricción y se insertó bajo el dominio del promotor hCMV-MIE de pEEI2. 4, que era un vector de expresión para células animales, para construir un vector pEEI2.4-A1L2Fc para secreción y expresión de la proteína de fusión α 1-L2-Fc, en la que la región extracelular N-terminal de la isoforma 1 de la subunidad nAChR α 1 humana y la región Fc de cadena pesada de IgG1 de anticuerpo humano estaban conectadas por una secuencia ligadora flexible (L2). Se muestra el esquema de la región de expresión de proteína en la Fig. 3.

(5) Construcción del vector de expresión de la proteína Fc-L2- α 1 (ejemplo comparativo)

Se preparó un vector para expresar la proteína de fusión Fc-L2- α 1 (SEQ ID N° 19) en el que se fusionaban la subunidad nAChR α 1 de α 1-L2-Fc preparada en (4) y la región constante de cadena pesada de anticuerpo en orden inverso a (4), intercalando un ligador flexible (L2).

Se realizó la preparación del vector mediante el método de PCR de la misma manera que en (2) y (4), usando el gen sintético artificial de SEQ ID N° 1 como molde.

Se trató el producto amplificado de ácido nucleico resultante con enzima de restricción y se insertó bajo el dominio del promotor hCMV-MIE de pEE12. 4, que era un vector de expresión para células animales, para construir un vector pEE12.4-FcL2A1 para secreción y expresión de la proteína de fusión Fc-L2- α 1, en la que la región Fc de cadena pesada de IgG1 de anticuerpo humano y la región extracelular N-terminal de la isoforma 1 de la subunidad nAChR α 1 humana estaban conectadas por una secuencia ligadora flexible (L2). Se muestra el esquema de la región de expresión de proteína en la Fig. 4.

(6) Construcción de cepas de expresión estables de las proteínas de fusión α 1-Fc, α 1-L-Fc, α 1-L2-Fc y Fc-L- α 1

Se transfirió cada uno de los vectores de expresión de proteína de fusión pEE12. 4-A1Fc, pEE12.4-A1LFC, pEE12.4-A1L2Fc y pEE12.4-FcL2A1 preparados en (1), (2), (4) y (5) a células CHO-K1 mediante un método de electroporación, se incubaron bajo selección con sulfoximina de metionina (MSX) y se clonaron para preparar un transformante. Se sometieron los transformantes resultantes (de aquí en adelante, cada uno de ellos se abreviará

como "célula de expresión de $\alpha 1$ -Fc", "célula de expresión de $\alpha 1$ -L-Fc", "célula de expresión de $\alpha 1$ -L2-Fc" y "célula de expresión de Fc-L2- $\alpha 1$ ") al siguiente experimento.

(7) Incubación de expresión de las proteínas de fusión $\alpha 1$ -Fc, $\alpha 1$ -L-Fc, $\alpha 1$ -L2-Fc y Fc-L2- $\alpha 1$

Se incubó cada una de las células de expresión de $\alpha 1$ -Fc, células de expresión de $\alpha 1$ -L-Fc, células de expresión de $\alpha 1$ -L2-Fc y células de expresión de Fc-L2- $\alpha 1$ preparadas en (6) usando 9 l de "medio CD-CHO" (nº de catálogo: 2490-025) de Invitrogen como medio incipiente para producir cada proteína. Las condiciones de incubación eran pH 7,1 a 37 °C y, durante el 5º al 9º día de incubación, se añadieron 50 ml/día de "CHO CD Efficient Feed B" (nº de catálogo: A1024-01) de Invitrogen y se realizó la incubación durante 10 días. Se obtuvo el líquido sobrenadante del cultivo de expresión de proteína de fusión centrifugando el cultivo a 3500XG durante 5 minutos para precipitar las células incubadas y recuperar el líquido sobrenadante de las mismas.

(8) Purificación de las proteínas de fusión $\alpha 1$ -Fc, $\alpha 1$ -L-Fc, $\alpha 1$ -L2-Fc y Fc-L2- $\alpha 1$ y cálculo de la cantidad expresada

Para cada líquido sobrenadante del cultivo de expresión de proteína de fusión obtenido en (7), se cargó una solución después de tratamiento de filtrado con un filtro de 0,45 μ m en "Mab select SuRe" (nº de catálogo: 11-0026-01) de GE Healthcare, se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS, se eluyó con 2,5 volúmenes de columna de tampón de ácido cítrico 20 mM (pH= 3,0) y se neutralizó inmediatamente el eluido con Tris-HCl 1 M (pH= 9,0) a una cantidad de 1/10 del eluido para purificar la proteína de fusión. Se concentró el eluido resultante usando "Amicon Ultra-1S, Ultracel-50K" (nº de catálogo: UFC905024) de Japan Millipore, se realizó la sustitución por PBS y se realizó un tratamiento de filtrado usando una membrana de filtro aséptica de 0,22 μ m, seguido de someter al siguiente experimento.

Se midió la absorbancia a 280 nm (DO280) de la fracción de eluido resultante y se calculó la cantidad expresada de proteína de fusión por 1 l de líquido incubado para cada cepa de expresión usando el coeficiente de absorción ($\alpha 1$ -Fc: 0,57 mg/ml/DO280, $\alpha 1$ -L-Fc: 0,59 mg/ml/DO280, $\alpha 1$ -L2-Fc: 0,59 mg/ml/DO280, Fc-L2- $\alpha 1$: 0,59 mg/ml/DO280) de cada proteína de fusión, la cantidad de eluido y la cantidad de líquido incubada.

El resultado fue que la cantidad expresada de proteína de fusión era de 72 mg/l para células de expresión de $\alpha 1$ -Fc, 1587 mg/l para células de expresión de $\alpha 1$ -L-Fc, 1249 mg/l para células de expresión de $\alpha 1$ -L2-Fc y 356 mg/l para células de expresión de Fc-L2- $\alpha 1$, y se confirmó que la cantidad expresada se potenciaba significativamente mediante la inserción de un péptido ligador flexible en el sitio de unión de la proteína de fusión. Entre ellas, una cepa de expresión de proteína de fusión que usa Pro-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ como ligador peptídico flexible era excelente.

(9) Confirmación de la capacidad de unión de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc con α -BTX

Con respecto a la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc obtenidas en (8), se confirmó la capacidad de unión de las mismas a α -bungarotoxina (de aquí en adelante, se abreviará como " α -BTX") y a proteína A con un método ELISA. La α -BTX es una sustancia que tiene la acción de inhibir la neurotransmisión al unirse al dominio $\alpha 1$. Por consiguiente, como resultado de la confirmación de la capacidad de unión de la proteína de fusión con α -BTX, es ahora posible confirmar si la estructura del dominio $\alpha 1$ de la proteína de fusión está correctamente formada. Además, la proteína A fija la proteína de fusión a una placa a través de Fc. Por consiguiente, aunque el propósito principal de este experimento es confirmar la formación de una estructura de dominio $\alpha 1$ de la proteína de fusión como se menciona anteriormente, también es posible en este experimento confirmar si se retiene la estructura de la proteína de fusión como una Fc.

Se inmovilizó "proteína A" (nº de catálogo: 987015) de ICN Biochemicals a la concentración de 1 μ g/ml en "C8 Maxisorp Nunc-Immuno Module" (nº de catálogo: 445101) de Nalge Nunc y se realizó entonces el bloqueo usando PBS al que se añadió 1 % de BSA, se añadieron cada una de las proteínas de fusión preparadas en (8) y sometidas a una serie de dilución de 4 veces a la misma en forma de una muestra seguida de lavado posterior, se añadió entonces " α -bungarotoxina, biotina-XX" (nº de catálogo B1196) de Invitrogen a la concentración de 1 μ g/ml y finalmente se realizó la reacción con "Peroxidasa-Avidina" (nº de catálogo: 191370) de ICN Biochemicals. Para la detección, se hizo reaccionar "solución TMB" (nº de catálogo N301) de Funakoshi como sustrato y se detuvo la reacción usando solución de ácido sulfúrico al 1 %. Después de eso, se midió la absorbancia a 450 nm de longitud de onda.

Se muestra el resultado en la Fig. 6. Para cualquiera de las proteínas de fusión, se señaló reacción dependiente de la concentración. A partir de este resultado, se confirmó que cada proteína de fusión se une a α -BTX y también se une a proteína A. Por tanto, se confirmó que tanto la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc como la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc retenían la región extracelular de la subunidad nAChR $\alpha 1$ y la estructura como Fc. Incidentalmente, cuando se compararon ambas proteínas de fusión, la curva de unión a α -BTX estaba significativamente desplazada al lado de menor concentración en la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc, con lo que se juzgó que, cuando se inserta el péptido ligador flexible, se potencia la capacidad de unión por concentración de proteína en una medida de aproximadamente 100 veces o más. Este resultado sugiere que, cuando se inserta péptido ligador flexible, aumenta la estabilidad estructural de la proteína de fusión pretendida y la pureza se vuelve alta.

(10) Confirmación de la capacidad de unión de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc al autoanticuerpo anti-nAChR

Se incubó Mab35 (TIB-175) (de aquí en adelante se abreviará como "células Mab35"), que es un hibridoma de producción de autoanticuerpo anti-nAChR de rata (subunidad $\alpha 1$) obtenido de la ATCC en "Hybridoma-SFM" (nº de catálogo: 12045-01) de Invitrogen y se trató el líquido sobrenadante del cultivo con "HiTrap Protein G HP Column" (nº de catálogo: 17-0405-01) de GE Healthcare, con lo cual se obtuvo un anticuerpo monoclonal (de aquí en adelante, se abreviará como "mAb35"), que es un autoanticuerpo anti-nAChR.

Se inmovilizó el mAb35 resultante a la concentración de 1 μ g/ml en C8 Maxisorp Nunc-Immunomodule de Nalge Nunc y se bloqueó usando PBS al que se añadió 1 % de BSA. Después de eso, se añadieron la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc preparadas en (8) y sometidas a una serie de dilución de 4 veces y, finalmente, se realizó la reacción usando anticuerpo anti-Fc de IgG humana marcado con HRP. Para la detección, se hizo reaccionar "solución TMB" de Funakoshi como sustrato y se detuvo la reacción usando solución de ácido sulfúrico al 1 %. Después de eso, se midió la absorbancia a 450 nm de longitud de onda.

Se muestra el resultado en la Fig. 7. Tanto la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc como la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc mostraban una reacción dependiente de la concentración. Cuando se compararon ambas, la curva de unión a autoanticuerpo estaba significativamente desplazada al lado de menor concentración en la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc, con lo que se juzgó que, cuando se inserta un péptido ligador flexible, se potencia la capacidad de unión (actividad específica) por concentración de proteína en una medida de aproximadamente 100 veces o más. Este resultado sugiere que, cuando se inserta internamente un péptido ligador flexible, no solo aumenta la cantidad expresada de la proteína de fusión pretendida, sino también la estabilidad estructural de la misma y se potencia significativamente la reactividad con autoanticuerpo.

(11) Confirmación de la capacidad de unión de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc con células de producción de autoanticuerpo

En un cuerpo vivo, los autoanticuerpos se producen en linfocitos B. Sobre la membrana celular de la superficie celular de los linfocitos B de producción de autoanticuerpos, se presentan los mismos anticuerpos que los autoanticuerpos como receptor de linfocitos B. Por tanto, sobre la membrana celular del hibridoma Mab35 usado en (10), es probable que el hibridoma Mab35 presente también el anticuerpo mAb35 igual que en el caso de los linfocitos B.

Se hicieron reaccionar ahora 2×10^5 células Mab35 lavadas con HBSS/BSA con cada una de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc preparadas en (8) diluidas 10 veces en un intervalo de 10 ng/ml a 1 mg/ml como muestras. Después de eso, se añadió anticuerpo anti-IgG humana marcado con PE como reactivo de detección y se realizó la detección usando "Cytomice FC500" de Beckman-Coulter.

Se muestra el resultado en la Fig. 8A y la Fig. 8B. Cada una de las proteínas de fusión se desplazaba al lado derecho de manera dependiente de la concentración, con lo que se confirmó que cada una de las proteínas de fusión se une a células Mab35 de manera dependiente de la concentración. Puesto que la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc estaba mucho más desplazada, se confirmó que, cuando se inserta un péptido ligador flexible, se potencia la capacidad de unión a células de producción de autoanticuerpo en una medida de aproximadamente 100 veces o más.

(12) Confirmación de la acción de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc como señuelo

La subunidad nAChR $\alpha 1$, similar a la de células de músculo humano, está presente en las células de neuroblastoma humano (TE-671) (de aquí en adelante, se abreviará como "células TE671") obtenidas de la ATCC. Por lo tanto, se confirmó la actividad inhibidora de unión de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc y la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc preparadas en (8) en la unión del autoanticuerpo mAb35 a células TE671.

Se añadieron 100 μ g/ml de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc o la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc a 2×10^5 células TE671 lavadas con HBSS/BSA. Como control, se añadió HBSS/BSA que no contenía proteína de fusión. Después, se añadió adicionalmente 1 μ g/ml de anticuerpo mAb35 al mismo, se añadió anticuerpo de IgG de rata marcado con PE como reactivo de detección y se realizó la detección usando "Cytomics FC 500".

Se muestra el resultado en la Fig. 9. Cuando se usó la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc, se señaló solo cierto efecto inhibitor a la concentración de 100 μ g/ml mientras que, cuando se usó la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc, se señaló suficiente efecto inhibitor a la concentración de 100 μ g/ml. A partir de este resultado, se confirmó una potenciación significativa de la actividad inhibidora por inserción interna del péptido ligador flexible.

(13) Confirmación de la actividad de ADCC de la proteína de fusión $\alpha 1$ -Fc, la proteína de fusión $\alpha 1$ -L-Fc y la proteína de fusión Fc-L2- $\alpha 1$

Se lavaron células Mab35 (2×10^5 células) con HBSS/BSA y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en

HBSS/BSA al que se añadió el tinte fluorescente "Calceína-AM" (nº de catálogo: C326) de Dojinsha para hacer una concentración 10 μ M, con lo que se incorporaba Calceína-AM a las células. Después de eso, se diseminaron las células Mab35 en una placa de 96 pocillos para dar 10.000 células por pocillo y entonces se añadieron a los mismos la proteína de fusión α 1-L-Fc preparada en (8) o un anticuerpo de control (Avastin o Enbrel) y linfocitos citolíticos naturales humanos NK92 (CRL-2407) obtenidos de la ATCC (de aquí en adelante, se abreviarán como "linfocitos NK92") a diversas concentraciones, seguido de incubación a 37 °C durante 4 horas. Después de la incubación, se realizó la separación por centrifugación a 300 x G durante 5 minutos para precipitar las células y se midió la fluorescencia de cada líquido sobrenadante (Ex= 485 nm, Em= 540 nm). Como resultado, aunque se señaló una citotoxicidad celular muy débil (citólisis natural) de manera dependiente de los números de linfocitos NK92, incluso en un grupo en el que solo se añadieron linfocitos NK92 (sin anticuerpo, etc. añadidos), se señaló una fuerte citotoxicidad celular de aproximadamente un 73 % como máximo en el grupo en el que se administró la proteína de fusión α 1-L-Fc, y se señaló una fuerte citotoxicidad celular en un grupo en el que se añadió una cantidad de 25 veces de linfocitos NK92 (es decir, las células efectoras (E)) a las células Mab35 (es decir, las células diana (T)) (datos no mostrados). A partir del resultado de los experimentos preliminares anteriores, se comparó la citotoxicidad celular entre la proteína de fusión α 1-Fc, la proteína de fusión α 1-L-Fc y la proteína de fusión Fc-L2- α 1 en condiciones en las que la relación de E/T era de 25.

Como resultado, se señalaron valores de citotoxicidad de 51,8 %, 73,2 % y 32,9 % en la proteína de fusión α 1-Fc, en la proteína de fusión α 1-L-Fc y en la proteína de fusión Fc-L2- α 1, respectivamente. Por otro lado, se señalaron valores de citotoxicidad celular de 17,9 %, 12,5 % y 6,9 % en un grupo en el que no se añadió anticuerpo, en un grupo añadido con Avastin y en un grupo añadido con Enbrel, respectivamente.

A partir de estos resultados, se confirmó que se exhibía la mayor citotoxicidad cuando la región constante de cadena pesada de anticuerpo no estaba situada en el lado N-terminal, sino que se situaba en el lado C-terminal. Se confirmó también que la citotoxicidad celular se potenciaba adicionalmente por la inserción interna de un péptido ligador flexible incluso en el caso en el que la región constante de cadena pesada de anticuerpo estuviera situada en el lado C-terminal.

(14) Confirmación de la prueba *in vivo* de miastenia grave

Para el experimento, se prepararon 36 ratas Lewis hembra de 11 semanas de edad (Nippon LSC). Como modelo animal para miastenia grave, se usó un modelo de inducción de autoanticuerpo en rata. Se administró por vía intraperitoneal mAb35, que es un autoanticuerpo de nAChR de rata producido por el hibridoma Mab35, a todas las ratas a una dosis de 1,25 mg/kg, con lo cual se indujo un estado mórbido. Se administró por vía intravenosa cada una de las siguientes sustancias después de 4, 12, 24 y 32 horas desde la administración de mAb35. Se administró a un grupo de control 1 ml de PBS cada vez (grupo de control, 6 ratas). Se administró α 1-L-Fc preparada en (8) a la dosis de 2,5 mg/rata (α 1-L-Fc 2,5, 6 ratas) o 10 mg/rata (α 1-L-Fc 10, 6 ratas) cada vez. De forma similar, se administró α 1-Fc preparada en (8) a la dosis de 2,5 mg/rata (α 1-Fc 2,5, 6 ratas) o 10 mg/rata (α 1-Fc 10, 6 ratas) cada vez. Además, se administró Venoglobulin IH al 5 % donada para inyección intravenosa (fabricado por Tanabe Mitsubishi), que era una preparación de inmunoglobulina humana para inyección intravenosa, a la dosis de 80 mg/rata (IVIG, 6 ratas) cada vez.

Durante el periodo de hasta 96 horas después de la inducción del estado mórbido, se evaluó la puntuación de síntomas musculares (puntuación MG). La puntuación de síntomas musculares es como sigue: 0 puntos para ninguna anomalía, 1 punto para rebaja del agarre de los miembros delanteros; 2 puntos para desaparición del agarre de los miembros delanteros, 3 puntos para rebaja de la fuerza muscular de los miembros traseros y trastorno de la marcha, además de desaparición del agarre de los miembros delanteros, y 4 puntos por parálisis de los miembros traseros además de desaparición del agarre de los miembros delanteros. Se realizó el análisis estadístico de la puntuación de síntomas musculares de tal manera que se hizo la comparación del control con cada grupo administrado con sustancia por la prueba de Steel (SAS Preclinical Package Versión 5.00.010720, versión de Windows (marca comercial registrada), SAS System Release 8.02 TS Level 02MO (SAS Institute Japan)). Se da el resultado en términos de (valor medio) $\pm$ (error estándar) y un valor de significación de menos del 5 % (*) se juzgó como una diferencia significativa.

Se muestra el resultado en la Tabla 1 y la Fig. 10. La Fig. 10 muestra el efecto de α 1-L-Fc y α 1-Fc en el modelo de miastenia grave en rata inducido por mAb35. Como se muestra en la Fig. 10, se observó un cambio tal en el grupo de control que la puntuación de síntomas musculares aumentó desde 24 horas después de la inducción del estado mórbido, se volvió máxima después de 56 horas y disminuyó después de ello. Tal tendencia mostró que α 1-L-Fc y α 1-Fc suprimían el aumento de la puntuación de los síntomas musculares y que la supresión como tal es dependiente de la dosis. La Tabla 1 muestra una puntuación media después de 56 horas desde la inducción del estado mórbido en la que la puntuación de síntomas musculares del grupo de control se volvía máxima. Se mostró que cualquiera de α 1-L-Fc y α 1-Fc suprimía significativamente los síntomas musculares mediante la administración de 10 mg/rata cada vez.

Tabla 1: Puntuación de síntomas musculares después de 56 horas desde la inducción del estado mórbido

	Puntuación de síntomas musculares
Control	2,3 ± 0,6
α 1-L-Fc 2,5	0,6 ± 0,3
α 1-L-Fc 10	0,3 ± 0,2*
α 1-Fc 2,5	1,1 ± 0,4
α 1-Fc 10	0,3 ± 0,2*
IVIG	0,9 ± 0,2

En los ejemplos anteriores, se confirmó el efecto para los casos en los que se usaba un péptido ligador que tiene un número de repetición de 3 (ligador flexible (L) (Pro-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)3) o ligador flexible (L2) ((Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)3)). A partir de esos resultados, los especialistas en la materia pueden predecir fácilmente que incluso los casos en los que el número de repetición (n) del péptido ligador es un entero de 1 a 8 o, particularmente, un entero de 1 a 4, conseguirán el mismo efecto excelente que los casos en los que el número de repetición (n) del péptido ligador es 3. Esto es debido a que la longitud del péptido ligador se dice que es habitualmente de aproximadamente 5 residuos (en otras palabras, el número de repetición (n) en la unidad constitutiva anterior es 1) a aproximadamente 20 residuos (en otras palabras, el número de repetición (n) en la unidad constitutiva anterior es 4).

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, la proteína de fusión, que puede prevenir o tratar la enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo de dos modos (concretamente, inhibición de la producción de anticuerpos y neutralización de los autoanticuerpos producidos), puede proporcionarse como un fármaco a una escala de producción real. Por lo tanto, la proteína de fusión de la presente invención puede usarse ampliamente para prevenir y tratar eficazmente diversas enfermedades autoinmunitarias de tipo autoanticuerpo tales como miastenia grave.

Texto libre del listado de secuencias

Las SEQ ID N° 3, 4, 6, 7, 16 y 17 son las secuencias de los cebadores.

Lista de secuencias

<110> Nihon Seiyaku Kabushiki Kaisha

<120> Proteína de fusión

<130> F-3719PT

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1413

<212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 1

ES 2 655 941 T3

```

aagcttgccg ccaccatgga gccctggcct ctccctcctgc tcttttagcct ttgctcagct      60
ggcctcgtcc tggggtccga acatgagacc cgtctggtgg caaagctatt taaagactac      120
agcagcgtgg tgcggccagt ggaagaccac cgccaggtcg tggaggtcac cgtgggcctg      180
cagctgatac agctcatcaa tgtggatgaa gtaaatacaga tcgtgacaac caatgtgcgt      240
ctgaaacagc aatgggtgga ttacaaccta aaatggaatc cagatgacta tggcgggtgtg      300
aaaaaaattc acattccttc agaaaagatc tggcgcccag acctgtttct ctataacaat      360
gcagatggtg actttgctat tgtcaagttc accaaagtgc tcctgcagta cactggccac      420
atcacgtgga cacctccagc catctttaa agctactgtg agatcatcgt caccacttt      480
ccctttgatg aacagaactg cagcatgaag ctgggcacct ggacctacga cggctctgtc      540
gtggccatca acccgaaag cgaccagcca gacctgagca acttcatgga gagcggggag      600
tgggtgatca aggagtcccg gggctggaag cactccgtga cctattcctg ctgccccgac      660
accccctacc tggacatcac ctaccacttc gtcatgcagc gcctggagcc caaatcttgt      720
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc      780
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca      840
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac      900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      960
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag     1020
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa     1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag     1140
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag     1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc     1260
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg     1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc     1380
ctctccctgt ctccgggtaa atgataagaa ttc                                     1413

```

5

<210> 2
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10

<400> 2

ES 2 655 941 T3

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

ES 2 655 941 T3

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

<210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> cebador

<400> 3

cccaagcttg ccgccaccat ggag 24

<210> 4
 <211> 81

ES 2 655 941 T3

	<212> ADN		
	<213> cebador		
	<400> 4		
5	gctcttaggc tccgatccgc caccgccaga gccacctccg cctgaaccgc ctccaccggg	60	
	cagccgttgc atgacgaagt g	81	
	<210> 5		
	<211> 768		
10	<212> ADN		
	<213> homo sapiens		
	<400> 5		
	cccaagcttg ccgccaccat ggagccatgg cccctgctcc ttcttttcag cctgtgttca	60	
	gctggcctcg tgctgggcag cgagcacgaa accagggttg tcgctaaact tttcaaagat	120	
	tactcctcag tagtgaggcc tgtagaggat catcggcagg tgggtggaggt cactgtggga	180	
	ctccagctca tccagttgat caatgtcgat gaggtcaacc aaatcgtcac cactaatgtc	240	
	cgactgaagc agcagtgggt cgactacaac ctgaagtgga atcccgatga ctacggtgggt	300	
	gtgaaaaaaa tacatattcc cagtgagaag atctggcgctc cagatcttgt tctgtacaac	360	
	aacgctgatg gagatttcgc tatcgtcaag ttcaccaaag tgctgctgca gtatacaggt	420	
	catataactt ggactcccc agcaatcttt aagagttact gcgagatcat agtgacccat	480	
	tttccctttg acgagcagaa ttgttccatg aagctgggca cttggacctc cgacgggtct	540	
	gtcgtggcta ttaatccaga aagcgatcag cccgatcttt caaatattat ggagtccggt	600	
	gagtgggtga tcaaagaatc aaggggttg aaacattcag tgacctactc ttgctgtcct	660	
	gatactccct acctcgacat tacctaccac ttcgtcatgc aacggctgcc cgggtggaggc	720	
15	ggttcaggcg gaggtggctc tggcgggtgg ggatcggagc ctaagagc	768	
	<210> 6		
	<211> 82		
	<212> ADN		
20	<213> cebador		
	<400> 6		
	caacggctgc ccggtggagg cggttcaggc ggaggtggct ctggcgggtg cggatcggag	60	
25	cctaagagct gcgataaaac ac	82	
	<210> 7		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> cebador		
30	<400> 7		
	ggaattctta tcattacct g	21	
35	<210> 8		
	<211> 766		
	<212> ADN		
	<213> homo sapiens		
40	<400> 8		

ES 2 655 941 T3

caacggctgc	ccggtggagg	cggttcaggc	ggaggtggct	ctggcggtgg	cggatcggag	60
cctaagagct	gcgataaaac	acacacatgc	cctccctgcc	ccgctccaga	gctgttgggc	120
ggaccaagcg	ttttcctggt	cccaccaaag	cccaaggaca	ctttgatgat	ctctcggact	180
cctgaagtga	catgcgtcgt	ggtagatgtc	tctcatgaag	atccagaggt	gaaatttaac	240
tggtatgtag	acggcgtgga	ggtgcacaat	gccaaaacca	agcctcgaga	agaacagtac	300
aatagtacat	accgagtggg	ttctgttttg	accgtgcttc	accaggactg	gctgaacgga	360
aaggaataca	aatgcaaggt	ctcaaacaag	gcattgccag	ccccatcga	aaagacaatt	420
tctaaagcca	aaggacagcc	cagagagcct	caggtgtata	ccctcccacc	atcacgagac	480
gaactcacia	aaaaccaggt	ttccctcacc	tgtctgggtga	aggggtttta	cccatctgat	540
atcgccgtcg	aatgggagtc	taacggacag	cctgagaata	attataagac	aactccacct	600
gtcctggaca	gtgatggatc	tttctttctg	tacagtaaac	tgaccgtgga	taagtcacgc	660
tggcaacaag	gtaatgtgtt	cagctgcagc	gtcatgcacg	aggctctgca	taaccattat	720
acacagaagt	cactctctct	gtccccaggt	aaatgataag	aattcc		766

<210> 9
 <211> 1465
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 9

cccaagcttg	ccgccaccat	ggagccatgg	cccctgctcc	ttcttttcag	cctgtgttca	60
gctggcctcg	tgctgggcag	cgagcacgaa	accaggttgg	tcgctaaact	tttcaaagat	120
tactcctcag	tagtgaggcc	tgtagaggat	catcggcagg	tggtggaggt	cactgtggga	180
ctccagctca	tccagttgat	caatgtcgat	gaggccaacc	aaatcgtcac	cactaatgtc	240
cgactgaagc	agcagtgggt	cgactacaac	ctgaagtgga	atcccgatga	ctacgggtgg	300
gtgaaaaaaa	tacatatattc	cagtgagaag	atctggcgtc	cagatcttgt	tctgtacaac	360
aacgctgatg	gagatttcgc	tatcgtcaag	ttcaccaaag	tgctgctgca	gtatacaggt	420
catataactt	ggactcccc	agcaatcttt	aagagttact	gcgagatcat	agtgacccat	480
tttccctttg	acgagcagaa	ttgttccatg	aagctgggca	cttggaacct	cgacgggtct	540

ES 2 655 941 T3

```

gtcgtgggcta ttaatccaga aagcgatcag cccgatcttt caaatTTTTat ggagtccgggt 600
gagtgggtga tcaaagaatc aaggggggtgg aaacattcag tgacctactc ttgctgtcct 660
gatactccct acctcgacat tacctaccac ttcgtcatgc aacggctgcc cggtgagggc 720
ggttcaggcg gaggtggctc tggcgggtggc ggatcggagc ctaagagctg cgataaaaca 780
cacacatgcc ctccctgccc cgctccagag ctgttgggcg gaccaagcgt tttcctgttc 840
ccaccaaagc ccaaggacac tttgatgatc tctcggactc ctgaagtgac atgcgtcgtg 900
gtagatgtct ctcatgaaga tccagagggtg aaatttaact ggtatgtaga cggcgtggag 960
gtgcacaatg ccaaaaccaa gcctcgagaa gaacagtaca atagtacata ccgagtgggt 1020
tctgttttga ccgtgcttca ccaggactgg ctgaacggaa aggaatacaa atgcaaggtc 1080
tcaaacaagg cattgccagc ccccatcgaa aagacaattt ctaaagccaa aggacagccc 1140
agagagcctc aggtgtatac cctcccacca tcacgagacg aactcacaaa aaaccagggt 1200
tccctcacct gtctggtgaa ggggttttac ccatctgata tcgccgtcga atgggagtct 1260
aacggacagc ctgagaataa ttataagaca actccacctg tcctggacag tgatggatct 1320
ttctttctgt acagtaaact gaccgtggat aagtcacgct ggcaacaagg taatgtgttc 1380
agctgcagcg tcatgcacga ggctctgcat aaccattata cacagaagtc actctctctg 1440
tccccaggta aatgataaga attcc 1465

```

<210> 10
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 10

```

Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys Asp Tyr Ser
1          5          10          15

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

Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile Asn Val Asp Glu Val Asn Gln
35        40        45

Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys Gln Gln Trp Val Asp Tyr Asn
50        55        60

Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys Ile His Ile
65        70        75        80

Pro Ser Glu Lys Ile Trp Arg Pro Asp Leu Val Leu Tyr Asn Asn Ala
85        90        95

```

ES 2 655 941 T3

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

ES 2 655 941 T3

340

345

350

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 11

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 11

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

ES 2 655 941 T3

100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
	165	170
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
	180	185
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
	195	200
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
	210	215
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
	225	230
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	245	250
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	260	265
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
	275	280
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	290	295
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
	305	310
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	330

<210> 12

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 12

ES 2 655 941 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	225	230	235	240

ES 2 655 941 T3

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 13
<211> 437
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 13

Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys Asp Tyr Ser
1 5 10 15

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

Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile Asn Val Asp Glu Val Asn Gln
35 40 45

Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys Gln Gln Trp Val Asp Tyr Asn
50 55 60

Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys Ile His Ile
65 70 75 80

Pro Ser Glu Lys Ile Trp Arg Pro Asp Leu Val Leu Tyr Asn Asn Ala
85 90 95

Asp Gly Asp Phe Ala Ile Val Lys Phe Thr Lys Val Leu Leu Gln Tyr
100 105 110

Thr Gly His Ile Thr Trp Thr Pro Pro Ala Ile Phe Lys Ser Tyr Cys
115 120 125

ES 2 655 941 T3

Glu Ile Ile Val Thr His Phe Pro Phe Asp Glu Gln Asn Cys Ser Met
 130 135 140
 Lys Leu Gly Thr Trp Thr Tyr Asp Gly Ser Val Val Ala Ile Asn Pro
 145 150 155 160
 Glu Ser Asp Gln Pro Asp Leu Ser Asn Phe Met Glu Ser Gly Glu Trp
 165 170 175
 Val Ile Lys Glu Ser Arg Gly Trp Lys His Ser Val Thr Tyr Ser Cys
 180 185 190
 Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu Asp Ile Thr Tyr His Phe Val Met Gln
 195 200 205
 Arg Leu Pro Leu Tyr Phe Ile Val Asn Val Ile Ile Pro Cys Leu Leu
 210 215 220
 Phe Ser Phe Leu Thr Gly Leu Val Phe Tyr Leu Pro Thr Asp Ser Gly
 225 230 235 240
 Glu Lys Met Thr Leu Ser Ile Ser Val Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe
 245 250 255
 Leu Leu Val Ile Val Glu Leu Ile Pro Ser Thr Ser Ser Ala Val Pro
 260 265 270
 Leu Ile Gly Lys Tyr Met Leu Phe Thr Met Val Phe Val Ile Ala Ser
 275 280 285
 Ile Ile Ile Thr Val Ile Val Ile Asn Thr His His Arg Ser Pro Ser
 290 295 300
 Thr His Val Met Pro Asn Trp Val Arg Lys Val Phe Ile Asp Thr Ile
 305 310 315 320
 Pro Asn Ile Met Phe Phe Ser Thr Met Lys Arg Pro Ser Arg Glu Lys
 325 330 335
 Gln Asp Lys Lys Ile Phe Thr Glu Asp Ile Asp Ile Ser Asp Ile Ser
 340 345 350
 Gly Lys Pro Gly Pro Pro Pro Met Gly Phe His Ser Pro Leu Ile Lys
 355 360 365
 His Pro Glu Val Lys Ser Ala Ile Glu Gly Ile Lys Tyr Ile Ala Glu
 370 375 380

ES 2 655 941 T3

Thr Met Lys Ser Asp Gln Glu Ser Asn Asn Ala Ala Ala Glu Trp Lys
385 390 395 400

Tyr Val Ala Met Val Met Asp His Ile Leu Leu Gly Val Phe Met Leu
405 410 415

Val Cys Ile Ile Gly Thr Leu Ala Val Phe Ala Gly Arg Leu Ile Glu
420 425 430

Leu Asn Gln Gln Gly
435

<210> 14

<211> 462

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 14

Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys Asp Tyr Ser
1 5 10 15

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

Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile Asn Val Asp Glu Val Asn Gln
35 40 45

Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys Gln Gly Asp Met Val Asp Leu
50 55 60

Pro Arg Pro Ser Cys Val Thr Leu Gly Val Pro Leu Phe Ser His Leu
65 70 75 80

Gln Asn Glu Gln Trp Val Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp
85 90 95

Tyr Gly Gly Val Lys Lys Ile His Ile Pro Ser Glu Lys Ile Trp Arg
100 105 110

Pro Asp Leu Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Asp Phe Ala Ile Val
115 120 125

Lys Phe Thr Lys Val Leu Leu Gln Tyr Thr Gly His Ile Thr Trp Thr
130 135 140

Pro Pro Ala Ile Phe Lys Ser Tyr Cys Glu Ile Ile Val Thr His Phe
145 150 155 160

ES 2 655 941 T3

Pro Phe Asp Glu Gln Asn Cys Ser Met Lys Leu Gly Thr Trp Thr Tyr
 165 170 175
 Asp Gly Ser Val Val Ala Ile Asn Pro Glu Ser Asp Gln Pro Asp Leu
 180 185 190
 Ser Asn Phe Met Glu Ser Gly Glu Trp Val Ile Lys Glu Ser Arg Gly
 195 200 205
 Trp Lys His Ser Val Thr Tyr Ser Cys Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu
 210 215 220
 Asp Ile Thr Tyr His Phe Val Met Gln Arg Leu Pro Leu Tyr Phe Ile
 225 230 235 240
 Val Asn Val Ile Ile Pro Cys Leu Leu Phe Ser Phe Leu Thr Gly Leu
 245 250 255
 Val Phe Tyr Leu Pro Thr Asp Ser Gly Glu Lys Met Thr Leu Ser Ile
 260 265 270
 Ser Val Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Leu Val Ile Val Glu Leu
 275 280 285
 Ile Pro Ser Thr Ser Ser Ala Val Pro Leu Ile Gly Lys Tyr Met Leu
 290 295 300
 Phe Thr Met Val Phe Val Ile Ala Ser Ile Ile Ile Thr Val Ile Val
 305 310 315 320
 Ile Asn Thr His His Arg Ser Pro Ser Thr His Val Met Pro Asn Trp
 325 330 335
 Val Arg Lys Val Phe Ile Asp Thr Ile Pro Asn Ile Met Phe Phe Ser
 340 345 350
 Thr Met Lys Arg Pro Ser Arg Glu Lys Gln Asp Lys Lys Ile Phe Thr
 355 360 365
 Glu Asp Ile Asp Ile Ser Asp Ile Ser Gly Lys Pro Gly Pro Pro Pro
 370 375 380
 Met Gly Phe His Ser Pro Leu Ile Lys His Pro Glu Val Lys Ser Ala
 385 390 395 400
 Ile Glu Gly Ile Lys Tyr Ile Ala Glu Thr Met Lys Ser Asp Gln Glu
 405 410 415
 Ser Asn Asn Ala Ala Ala Glu Trp Lys Tyr Val Ala Met Val Met Asp
 420 425 430
 His Ile Leu Leu Gly Val Phe Met Leu Val Cys Ile Ile Gly Thr Leu
 435 440 445
 Ala Val Phe Ala Gly Arg Leu Ile Glu Leu Asn Gln Gln Gly
 450 455 460

ES 2 655 941 T3

<210> 15
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<400> 15

Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys Asp Tyr Ser
 1 5 10 15

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

Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile Asn Val Asp Glu Val Asn Gln
 35 40 45

Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys Gln Gln Trp Val Asp Tyr Asn
 50 55 60

Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys Ile His Ile
 65 70 75 80

Pro Ser Glu Lys Ile Trp Arg Pro Asp Leu Val Leu Tyr Asn Asn Ala
 85 90 95

Asp Gly Asp Phe Ala Ile Val Lys Phe Thr Lys Val Leu Leu Gln Tyr
 100 105 110

Thr Gly His Ile Thr Trp Thr Pro Pro Ala Ile Phe Lys Ser Tyr Cys
 115 120 125

Glu Ile Ile Val Thr His Phe Pro Phe Asp Glu Gln Asn Cys Ser Met
 130 135 140

Lys Leu Gly Thr Trp Thr Tyr Asp Gly Ser Val Val Ala Ile Asn Pro
 145 150 155 160

Glu Ser Asp Gln Pro Asp Leu Ser Asn Phe Met Glu Ser Gly Glu Trp
 165 170 175

ES 2 655 941 T3

Val	Ile	Lys	Glu	Ser	Arg	Gly	Trp	Lys	His	Ser	Val	Thr	Tyr	Ser	Cys	
			180					185					190			
Cys	Pro	Asp	Thr	Pro	Tyr	Leu	Asp	Ile	Thr	Tyr	His	Phe	Val	Met	Gln	
		195					200					205				
Arg	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
	210					215					220					
Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
225					230					235					240	
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
				245					250						255	
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
			260					265						270		
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
		275					280					285				
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
	290					295					300					
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
305					310					315					320	
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				325					330					335		
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
			340					345					350			
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	
		355					360					365				
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
	370					375					380					
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
385					390					395					400	
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
				405					410					415		
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
				420				425					430			
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
		435					440				445					
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
	450					455										

ES 2 655 941 T3

	<210> 16		
	<211> 78		
	<212> ADN		
	<213> cebador		
5	<400> 16		
	gctcttaggc tccgatccgc caccgccaga gccacctccg cctgaaccgc ctccaccag	60	
	ccgttgcatg acgaagtg	78	
10	<210> 17		
	<211> 79		
	<212> ADN		
	<213> cebador		
15	<400> 17		
	caacggctgg gtggaggcgg ttcaggcggg ggtggctctg gcggaggcgg atcggagcct	60	
	aagagctgcg ataaaacac	79	
20	<210> 18		
	<211> 1462		
	<212> ADN		
	<213> homo sapiens		
25	<400> 18		
	cccaagcttg ccgccaccat ggagccatgg cccctgctcc ttcttttcag cctgtgttca	60	
	gctggcctcg tgctgggcag cgagcacgaa accaggttgg tcgctaaact tttcaaagat	120	
	tactcctcag tagtgaggcc tgtagaggat catcggcagg tggtaggagt cactgtggga	180	
	ctccagctca tccagttgat caatgtcgat gaggtcaacc aaatcgtcac cactaatgtc	240	
	cgactgaagc agcagtgggt cgactacaac ctgaagtgga atcccgatga ctacggtggt	300	
	gtgaaaaaaaa tacatatctc cagtgagaag atctggcgtc cagatcttgt tctgtacaac	360	
	aacgctgatg gagatttcgc tatcgtcaag ttcaccaaag tgctgctgca gtatacaggt	420	
	catataactt ggactcccc agcaatcttt aagagttact gcgagatcat agtgacccat	480	
	tttccctttg acgagcagaa ttgttccatg aagctgggca cttggacctc cgacgggtct	540	
	gtcgtggcta ttaatccaga aagcgatcag cccgatcttt caaatatttat ggagtccggt	600	
	gagtgggtga tcaaagaatc aagggggtgg aaacattcag tgacctactc ttgctgtcct	660	
	gatactccct acctcgacat tacctaccac ttcgtcatgc aacggctggg tggaggcggg	720	

ES 2 655 941 T3

```

tcaggcggag gtggctctgg cggtggcgga tcggagccta agagctgcga taaaacacac 780
acatgccctc cctgccccgc tccagagctg ttgggcggac caagcgtttt cctgttccca 840
ccaaagccca aggacacttt gatgatctct cggactcctg aagtgacatg cgtcgtggta 900
gatgtctctc atgaagatcc agaggtgaaa tttaactggg atgtagacgg cgtggagggtg 960
cacaatgcca aaaccaagcc tcgagaagaa cagtacaata gtacataccg agtggtttct 1020
gttttgaccg tgcttcacca ggactggctg aacggaaagg aatacaaatg caaggtctca 1080
aacaaggcat tgccagcccc catcgaaaag acaatttcta aagccaaagg acagcccaga 1140
gagcctcagg tgtataccct ccacccatca cgagacgaac tcacaaaaaa ccaggtttcc 1200
ctcacctgtc tggatgaagg gttttacca tctgatatcg ccgtcgaatg ggagtctaac 1260
ggacagcctg agaataatta taagacaact ccacctgtcc tggacagtga tggatctttc 1320
tttctgtaca gtaaaactgac cgtggataag tcacgctggc aacaaggtaa tgtgttcagc 1380
tgcagcgtca tgcacgaggc tctgcataac cattatacac agaagtcact ctctctgtcc 1440
ccaggtaaat gataagaatt cc 1462

```

<210> 19
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 19

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1          5          10          15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20          25          30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35          40          45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50          55          60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65          70          75          80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85          90          95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100         105         110

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

```

ES 2 655 941 T3

115		120		125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr				
130		135		140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser				
145		150		155
				160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr				
	165		170	175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr				
	180		185	190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe				
	195		200	205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys				
	210		215	220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly				
	225		230	235
				240
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala				
	245		250	255
Lys Leu Phe Lys Asp Tyr Ser Ser Val Val Arg Pro Val Glu Asp His				
	260		265	270
Arg Gln Val Val Glu Val Thr Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile				
	275		280	285
Asn Val Asp Glu Val Asn Gln Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys				
	290		295	300
Gln Gln Trp Val Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly				
	305		310	315
				320
Gly Val Lys Lys Ile His Ile Pro Ser Glu Lys Ile Trp Arg Pro Asp				
	325		330	335
Leu Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Asp Phe Ala Ile Val Lys Phe				
	340		345	350
Thr Lys Val Leu Leu Gln Tyr Thr Gly His Ile Thr Trp Thr Pro Pro				
	355		360	365

ES 2 655 941 T3

Ala Ile Phe Lys Ser Tyr Cys Glu Ile Ile Val Thr His Phe Pro Phe
370 375 380

Asp Glu Gln Asn Cys Ser Met Lys Leu Gly Thr Trp Thr Tyr Asp Gly
385 390 395 400

Ser Val Val Ala Ile Asn Pro Glu Ser Asp Gln Pro Asp Leu Ser Asn
405 410 415

Phe Met Glu Ser Gly Glu Trp Val Ile Lys Glu Ser Arg Gly Trp Lys
420 425 430

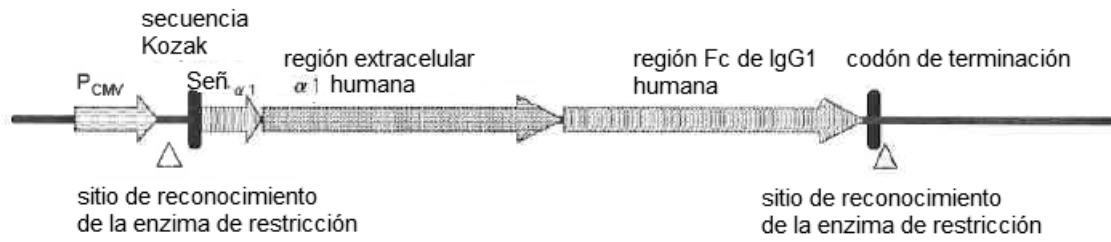
His Ser Val Thr Tyr Ser Cys Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu Asp Ile
435 440 445

Thr Tyr His Phe Val Met Gln Arg Leu
450 455

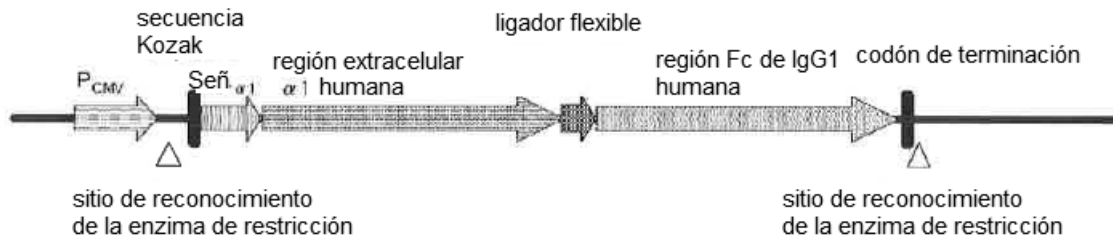
REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión caracterizada porque una proteína (X), que contiene un sitio reconocido por autoanticuerpos que son la causa de una enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo, está conectada con una proteína (A), que contiene un fragmento de la región constante de cadena pesada de anticuerpo que exhibe citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, y con un péptido ligador (L) consistente en uno o más aminoácidos, en la que la proteína (X), el péptido ligador (L) y la proteína (A) están conectados en este orden mediante un enlace peptídico de extremo N a extremo C,
5 y en la que la proteína de fusión consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID N° 10 o 15.
2. Un método para fabricar la proteína de fusión de la reivindicación 1, caracterizado porque el ADN que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 1 se inserta en un vector de expresión celular y este vector se introduce en células hospedadoras para expresar la proteína de fusión.
10
3. Una composición para uso en la prevención y el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria de tipo autoanticuerpo, caracterizada porque contiene la proteína de fusión de la reivindicación 1 como ingrediente eficaz.

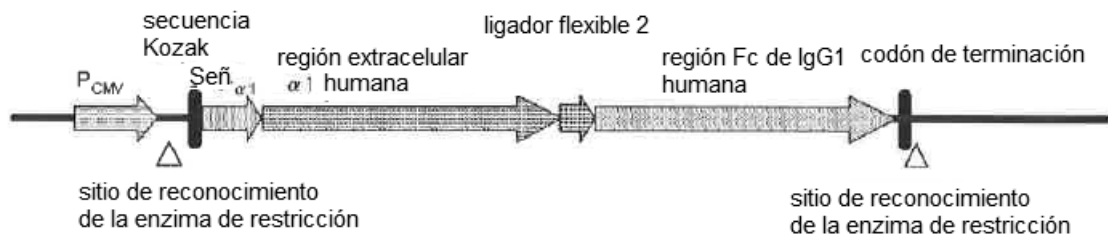
[Fig. 1]



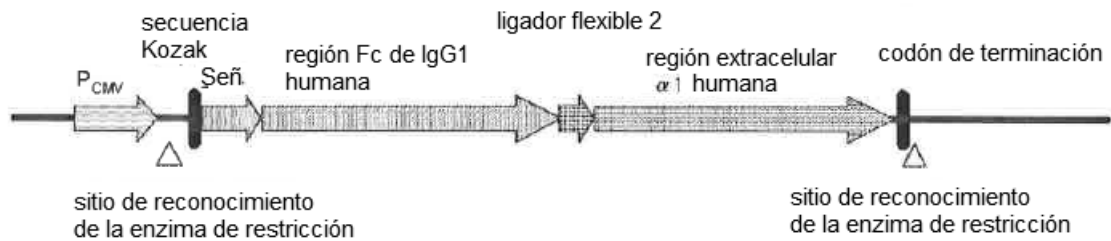
[Fig. 2]



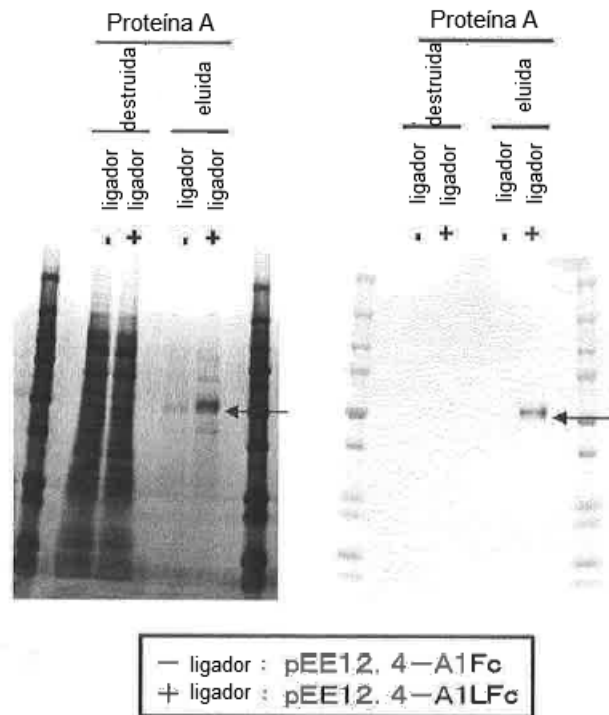
[Fig. 3]



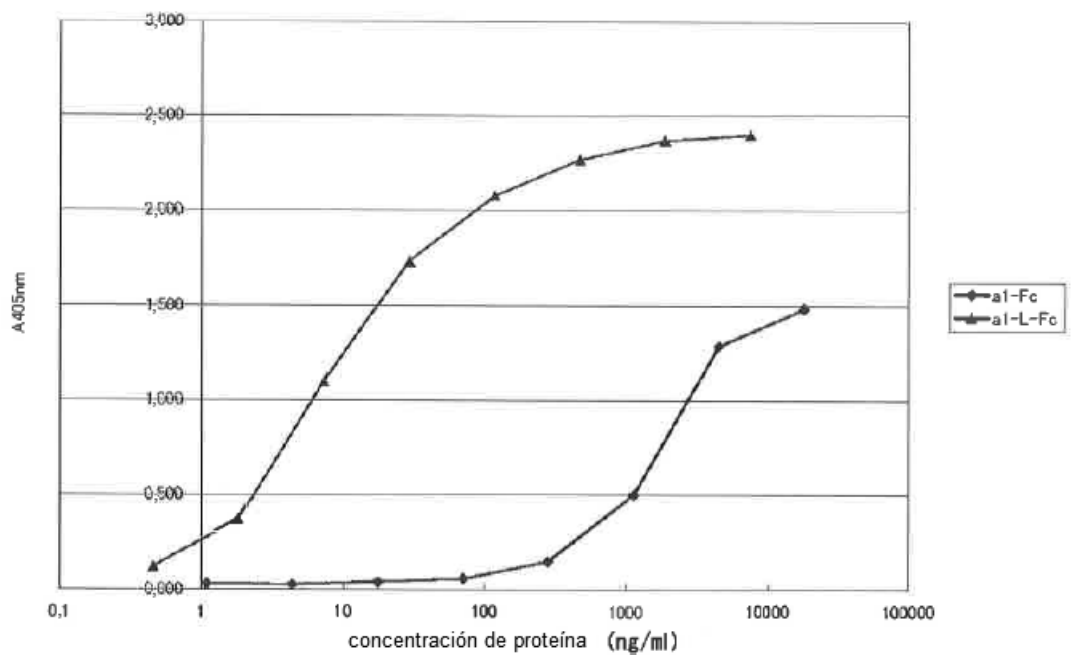
[Fig. 4]



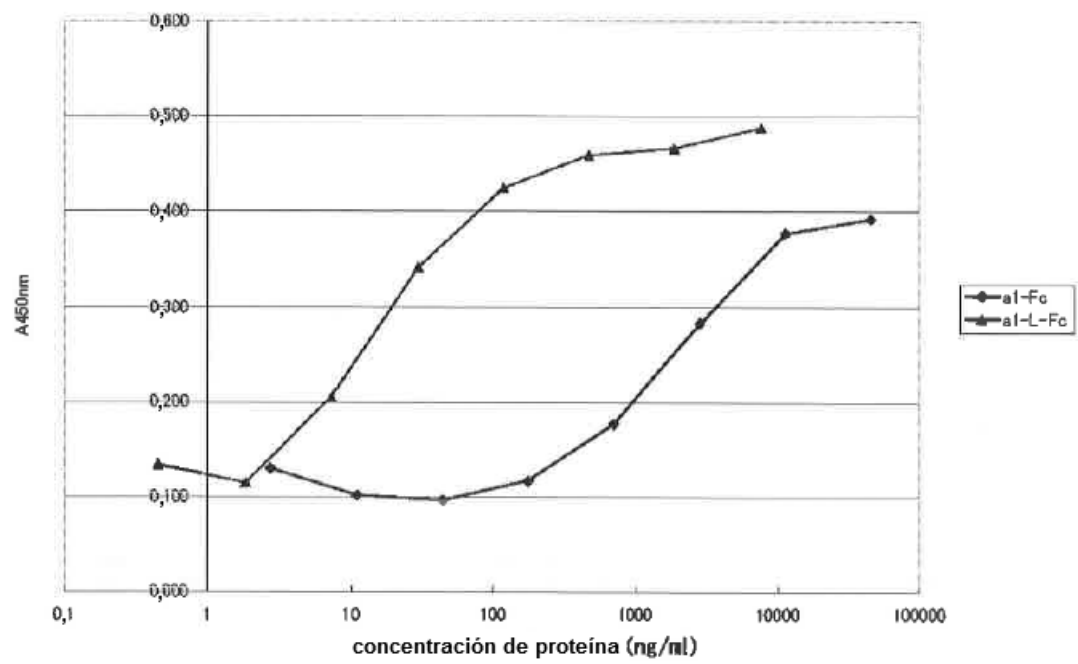
[Fig. 5]



[Fig. 6]

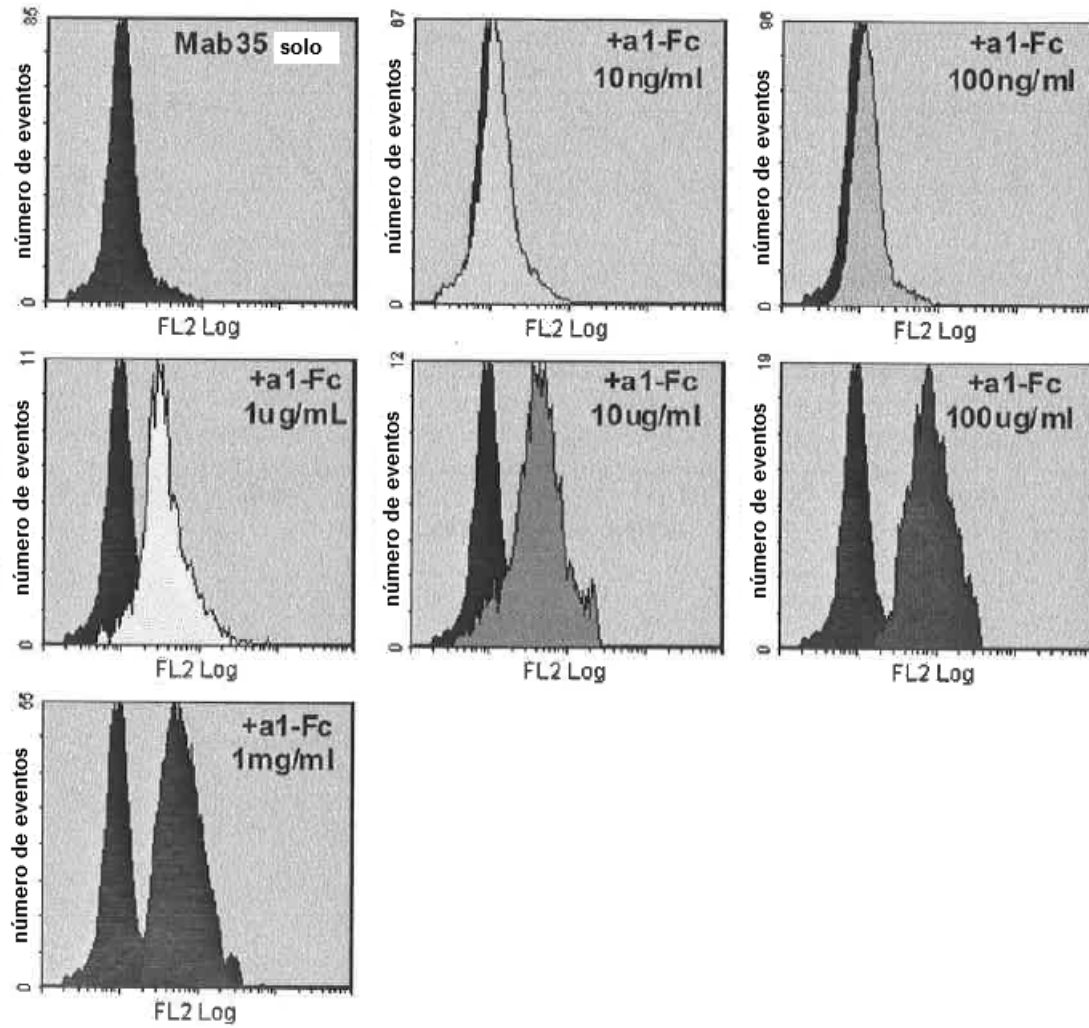


[Fig. 7]



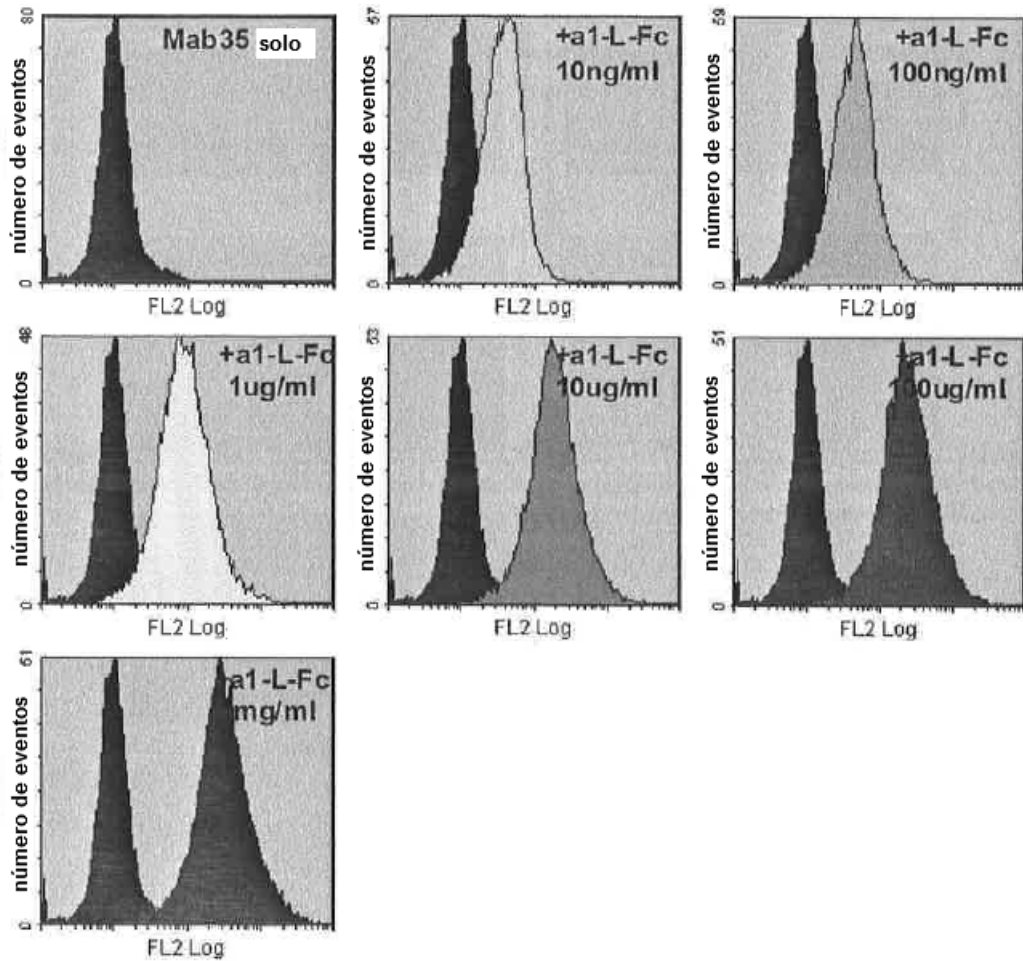
[Fig. 8A]

a1-Fc

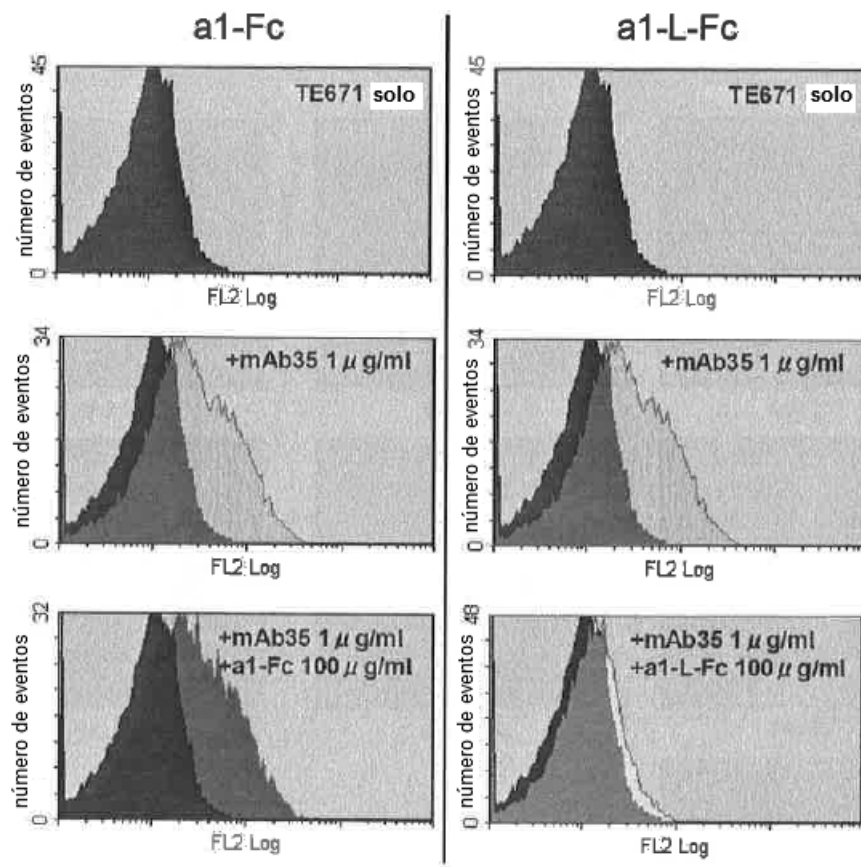


[Fig. 8B]

a1-L-Fc



[Fig. 9]



[Fig. 10]

