

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 539**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2012** **PCT/US2012/068718**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13095966**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2012** **E 12860516 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018** **EP 2793943**

54 Título: **Polipéptidos antiinflamatorios no sialilados**

30 Prioridad:

19.12.2011 US 201161577361 P

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

04.12.2018

73 Titular/es:

THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)
New York, NY 10065, US

72 Inventor/es:

RAVETCH, JEFFREY V. y
PINCETIC, ANDREW

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 692 539 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

Polipéptidos antiinflamatorios no sialilados

5 Intereses gubernamentales

La invención que se desvela en el presente documento se realizó, al menos en parte, con apoyo gubernamental bajo Concesión N.º NIH AI035875 del National Institutes of Health. Por consiguiente, el gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos en la presente invención.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a agentes antiinflamatorios, a composiciones y a métodos para tratar trastornos inflamatorios.

15 Antecedentes

Los trastornos inflamatorios, incluyendo las enfermedades autoinmunitarias, son trastornos que implican activación anómala y posterior migración de los glóbulos blancos a zonas afectadas del cuerpo. Estas afecciones incluyen una amplia gama de dolencias que afectan las vidas de millones de personas en todo el mundo. Aunque en la actualidad hay diversos tratamientos disponibles, muchos poseen efectos secundarios significativos o no son muy eficaces para aliviar todos los síntomas. Por lo tanto, existen necesidades de agentes antiinflamatorios para el tratamiento de trastornos inflamatorios y necesidades de métodos para identificar y evaluar agentes de ese tipo.

La inmunoglobulina G (IgG) se ha valorado desde hace tiempo porque es un mediador en actividades tanto pro- como antiinflamatorias a través de interacciones mediadas por su fragmento Fc. Aunque las interacciones Fc-FcγR son responsables de las propiedades proinflamatorias de complejos inmunológicos y anticuerpos citotóxicos, la gamma globulina intravenosa (IVIG) y sus fragmentos Fc son antiinflamatorios y se usan ampliamente para suprimir enfermedades inflamatorias. Se ha propuesto que la glicosilación de IgG es fundamental para la regulación de la citotoxicidad y el potencial inflamatorio de la IgG. Por ejemplo, se ha sugerido que la actividad antiinflamatoria de la IVIG es una propiedad del fragmento Fc y su glicano unido, que requiere enlaces en α.2,6 de ácido siálico terminales, lo que indica un requisito combinado para la estructura principal polipeptídica específica y la estructura de glicano para inmunosupresión. (Anthony, *et al.*, 2008, Science 320: 373-376 y documento WO 2007/117505).

Sin embargo, solo una población menor de IgG en IVIG tiene glicanos que terminan en α.2,6 de ácidos siálicos (sFc) y la actividad antiinflamatoria. Como resultado, para la supresión de la inflamación desencadenada por autoanticuerpos en una diversidad de entornos clínicos, la IVIG se tiene que administrar en dosis elevadas (1-2 g/kg) para enriquecer las IgG sialiladas o, de otro modo aumentar la sialilación de las IgG (Solicitudes de Estados Unidos N.ºs 20080206246, y 20090004179, y Nimmerjahn *et al. Annu Rev Immunol* 26, 513-533 (2008)).

Lund *et al. J Immunol* 157, 4963-4969 (1996) desvela variantes de Fc en las que la sustitución de los restos 241, 243, 264, 265 o 301 con alanina dio como resultado un aumento de la galactosilación y la sialilación con respecto a las cadenas de oligosacárido de tipo silvestre.

La presente invención aborda y satisface las necesidades que se han mencionado anteriormente mediante la identificación de polipéptidos antiinflamatorios sin sialilación.

Sumario

La presente invención se refiere a polipéptidos y a sus usos para tratar trastornos inflamatorios, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención presenta un polipéptido aislado que comprende una secuencia modificada que comprende la SEQ ID NO: 2, en la que la secuencia modificada no está sialilada y el polipéptido tiene una actividad antiinflamatoria que es más elevada que la de un polipéptido sialilado precursor que comprende la SEQ ID NO: 1; y en la que el polipéptido aislado tiene una capacidad para unirse a DC-SIGN, hFcγRIIA y RIIB. En una realización, el polipéptido aislado tiene una capacidad para unirse a hFcγRIIA o RIIB a una K_D de 2×10^{-5} M o inferior (es decir, K_A de $5,0 \times 10^4$ M⁻¹ o superior). En algunos ejemplos, la secuencia modificada consiste en la SEQ ID NO: 2.

La descripción desvela un método para preparar un polipéptido que tiene una actividad antiinflamatoria. El método incluye, entre otros, etapas para proporcionar un polipéptido precursor que tiene la secuencia de una región Fc de IgG o una primera secuencia de ácidos nucleicos codifica el polipéptido precursor; y modificar el polipéptido precursor para obtener un polipéptido modificado de modo que el polipéptido modificado esta libre de sialilación e imita la estructura de una forma sialilada de la región Fc de IgG. La etapa de modificación se puede realizar modificando la primera secuencia de ácidos nucleicos para obtener un segundo ácido nucleico que codifica el

polipéptido modificado. La descripción también proporciona un polipéptido preparado con el método que se acaba de describir.

En un segundo aspecto, la invención presenta un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica el polipéptido que se ha descrito anteriormente; un vector de expresión que comprende el ácido nucleico; y una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico. La invención también presenta un método para producir un polipéptido que comprende cultivar la célula hospedadora en un medio en condiciones que permitan la expresión de un polipéptido codificado por el ácido nucleico, y purificar el polipéptido de la célula cultivada o del medio de la célula.

En un tercer aspecto, la invención presenta una formulación farmacéutica que comprende (i) el polipéptido o ácido nucleico que se ha descrito anteriormente, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado como se ha descrito anteriormente, o un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido que se ha mencionado anteriormente, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. La descripción también desvela un método para tratar una enfermedad inflamatoria que incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o ácido nucleico que codifica el polipéptido que se han mencionado anteriormente. También se proporciona el uso del polipéptido o ácido nucleico en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria. La descripción también presenta un polipéptido aislado, ácido nucleico, vector de expresión, célula hospedadora, composición, o método para tratar una enfermedad inflamatoria esencialmente como se muestra y se describe en el presente documento.

Los detalles de una o más organizaciones de la invención se establecen en la descripción que sigue a continuación. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

Las FIGs. 1a-c son diagramas y fotografías que muestran que el ácido siálico unido en $\alpha 2,6$ proporcionó actividad de unión de DC-SIGN a Fc de IgG1 humana recombinante.

Las FIGs. 2a-b son diagramas y fotografías que muestran que la interrupción de las interacciones Fc-glicano proporcionaban actividad de unión de DC-SIGN a Fc de IgG1 humana recombinante.

La FIG. 3 es un conjunto de diagramas que muestran que la mutación FA241 en Fc de hIgG1 resume la actividad antiinflamatoria de sFc en $\alpha 2,6$.

Las FIGs. 4a-d son diagramas que muestran requisitos de caracterización para actividad antiinflamatoria de FA241.

La FIG. 5 es un conjunto de diagramas que muestran que la mutación FA241 aumentó la unión al receptor Fc γ .

Las FIGs. 6a-b son fotografías que muestran inducción de ARNm de IL-33 en macrófagos obtenidos de médula ósea por FA241.

Descripción detallada

La presente invención se basa, al menos en parte, en un descubrimiento inesperado de que las variantes de Fc de IgG no sialilada transmiten actividad antiinflamatoria e imitan el efecto del Fc sialilado en 2,6 como mediadores antiinflamatorios.

Sialilación de IgG y Fc

La IgG es la inmunoglobulina de suero principal. Es una glicoproteína formada por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas, que a su vez están formadas por dominio variable y constante. La IgG contiene un solo glicano unido en N en Asn²⁹⁷ en el dominio CH2 en cada una de sus dos cadenas pesadas. El carbohidrato complejo, unido con enlace covalente está formado por un núcleo de polisacárido penta-polisacárido biantenar, que contiene N-acetilglucosamina (GlcNAc) y manosa (man). De forma variable se encuentra modificación adicional de la estructura de carbohidrato núcleo se observa en anticuerpos de suero con la presencia de restos de fucosa, GlcNAc de ramificación, galactosa (gal) y ácido siálico terminal (sa). Por lo tanto se han detectado más de 40 glicoformas diferentes que se van a unir con enlace covalente a este único sitio de glicosilación (Fujii *et al.*, J. Biol. Chem. 265, 6009, 1990). Se ha mostrado que la glicosilación de IgG es esencial para la unión a todos los Fc γ R manteniendo una conformación abierta de las dos cadenas pesadas. Jefferis y Lund, Immune. 1 Lett. 82, 57 (2002), Sondermann *et al.*, J. Mol. Biol. 309, 737 (2001). Se cree que está glicosilación de IgG para unión a Fc γ R representa la incapacidad de los anticuerpos de IgG desglucosilados para mediar en respuestas inflamatorias desencadenadas *in vivo*, tales como ADCC, fagocitosis y la liberación de mediadores inflamatorios. Nimmerjahn y Ravetch, Immunity

24, 19 (2006). Se han sugerido observaciones adicionales de que las glicoformas de IgG individuales pueden contribuir a la modulación de respuestas inflamatorias por las afinidades alteradas de los FcγR individuales informados para anticuerpos de IgG que contienen lo que carecen de fucosa y sus consiguientes efectos en la citotoxicidad. Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 277, 26733 (2002), Nimmerjahn y Ravetch, Science 310, 1510 (2005).

5 Una relación entre estados autoinmunitarios y patrones de glicosilación específicos de anticuerpos de IgG se ha observado en pacientes con artritis reumatoide y varias autoimmune vasculitis en los que se ha informado de disminución de la galactosilación y sialilación de anticuerpos de IgG. Parekh *et al.*, Nature 316, 452 (1985), Rademacher *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6123 (1994), Matsumoto *et al.*, 128, 621 (2000), Holland *et al.*, Biochim. Biophys. Acta December 27. También se informado que variaciones en glicoformas de IgG están asociadas

10 con envejecimiento y con inmunización, aunque la significancia *in vivo* de estas alteraciones no se ha determinado. Shikata *et al.*, Glycoconj. J. 15, 683 (1998) Lastra, *et al.*, Autoimmunity 28, 25 (1998).

Como se desvela en el presente documento, ciertas variantes de Fc IgG de no sialilada también proporcionan de forma sorprendente una actividad antiinflamatoria. Tales variantes, incluyendo la variante FA241, representan

15 especies dentro de un género de moléculas de mayor tamaño, en virtud de la imitación de las propiedades estructurales y biológicas del Fc sialilado, pero no requieren sialilación, se pueden desarrollar como agentes terapéuticos antiinflamatorios.

Polipéptidos y Ácidos Nucleicos

Polipéptidos

Como se desvela en el presente documento, la presente invención proporciona polipéptidos aislados que tienen secuencias de variantes de Fc de IgG humana que carece de una cadena de polisacáridos que tiene un ácido siálico

25 terminal conectado a un resto de galactosa a través del enlace en α2,6 en la Asn²⁹⁷ que se ha mencionado anteriormente. Tales variantes de Fc de IgG no sialiladas se pueden obtener de un anticuerpo que se produce de manera natural, o expresadas en una línea celular.

En una realización, la región Fc incluye una o más sustituciones de la secuencia de aminoácidos de hlgG1. Aunque

30 no se limita a estas, las siguientes regiones de Fc de IgG1 se proporcionan como sigue a continuación:

Fc de hlgG1 (comenzando desde el aminoácido 210 en el sistema de Kabat):

KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 1; F241 y F243 están subrayados)

Fc de hlgG1 FA241:

KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 2)

Fc de hlgG1 FA243:

KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 3)

En el presente documento los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" se usan indistintamente para describir la colocación de restos de aminoácido en un polímero. Un péptido, polipéptido, o proteína puede estar formado por los

40 20 aminoácidos que se produce de forma natural convencionales, además de aminoácidos raros y análogos de aminoácido sintéticos. Pueden ser cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud de la modificación posterior a la traducción (por ejemplo, glicosilación o fosforilación). El péptido, polipéptido, o proteína "de la presente invención" incluye de versiones producidas de forma recombinante o de forma sintética que tienen

los dominios o porciones particulares que se unen a DC-SIGN, FcγRIIA, y FcγRIIB. El término también incluye polipéptidos que tienen un resto de metionina amino-terminal (utiliza la expresión en células procariotas).

Un polipéptido o proteína "aislados" se refiere a un polipéptido o proteína que se ha separado de otras proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos con los que se asocia de forma natural. El polipéptido/proteína puede constituir al menos un 10 % (es decir, cualquier porcentaje entre un 10 % y un 100 %, por ejemplo, un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, y un 99 %) en peso seco de la preparación purificada. La pureza se puede medir mediante cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, por cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliácridamida, o análisis de HPLC. Un polipéptido/proteína aislado que se describe en la invención se puede purificar de una fuente natural, se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante métodos químicos. Un equivalente funcional de Fc de IgG se refiere a un derivado polipeptídico de Fc de IgG, por ejemplo, una proteína que tiene una o más mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, truncamientos, una proteína de fusión, o una combinación de los mismos. Conserva esencialmente la actividad del Fc de IgG, es decir, la capacidad para unirse al respectivo receptor y desencadenar la respectiva respuesta celular. El polipéptido aislado puede contener la SEQ ID NO: 2. En general, el equivalente funcional es idéntico en al menos un 75 % (por ejemplo, cualquier número entre un 75 % y un 100 %, inclusive, por ejemplo, idéntico en un 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, y un 99 %) a la SEQ ID NO: 2.

El "porcentaje de identidad" de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68, 1990, modificado como en Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-77, 1993. Un algoritmo de ese tipo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990. Las búsquedas de nucleótido con BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína con BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Cuando existen espacios entre dos secuencias, se puede usar BLAST con Espacios como se describe en Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402, 1997. Cuando se usan los programas BLAST y BLAST con Espacios, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

La composición de los aminoácidos del polipéptido que se describe en el presente documento puede variar sin alterar la capacidad del polipéptido para unirse al respectivo receptor y desencadenarla respectiva respuesta celular. Por ejemplo, puede contener una o más sustituciones de aminoácido conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el resto de aminoácidos se sustituye con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2, se sustituye preferentemente con otro resto de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral. Como alternativa, se pueden introducir mutaciones de forma aleatoria a lo largo de toda o parte de las secuencias, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los votantes resultantes se pueden identificar sistemáticamente para la capacidad para unirse al respectivo receptor y desencadenar la respectiva respuesta celular para identificar mutantes que retienen la actividad como se describe a continuación en los ejemplos.

Un polipéptido como se describe en la presente invención se puede obtener como un polipéptido recombinante. Para preparar un polipéptido recombinante, un ácido nucleico que lo codifica (por ejemplo, FA241, SEQ ID NO: 2) se puede unir a otro ácido nucleico que codifica un asociado de fusión, por ejemplo, glutatión-s-transferasa (GST), etiqueta de epítipo de 6x-His, o proteína del Gen 3 de M13. El ácido nucleico de fusión resultante expresa, en células hospedadoras adecuadas, una proteína de fusión que se puede aislar con métodos conocidos en la técnica. La proteína de fusión aislada se puede tratar adicionalmente, por ejemplo, mediante digestión enzimática, para retirar el asociado de fusión y obtener el polipéptido recombinante de la presente invención.

Ácidos Nucleicos

Otro aspecto de la invención presenta un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica el polipéptido o proteína que se ha descrito anteriormente. Un ácido nucleico se refiere a una molécula de ADN (por ejemplo, un ADNc o ADN genómico), una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm), o un análogo de ADN o ARN. Un análogo de ADN o ARN se puede sintetizar a partir de análogos de nucleótido. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es un ADN bicatenario. Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de cualquier ácido nucleico que se produce de forma natural o a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico que se produce de forma natural. Por lo tanto la expresión cubre, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de la molécula de ADN genómico que se produce de forma natural pero que no está flanqueado por ambas secuencias codificantes que flanquean parte de la

molécula en el genoma del organismo en el que se produce de forma natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procariota o eucariota de un modo tal que la molécula resultante no es idéntica a ningún vector o ADN genómico que se produce de forma natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión. El ácido nucleico que se ha descrito anteriormente se puede usar para expresar la proteína de fusión de la presente invención. Para este fin, el ácido nucleico se puede unir de forma operativa a secuencias reguladoras adecuadas para generar un vector de expresión.

Un vector se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. El vector puede ser capaz de replicación autónoma o integrarse en un ADN hospedador. Los ejemplos del vector incluyen un plásmido, cósmido, o vector viral. El vector incluye un ácido nucleico en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora. Preferentemente el vector incluye una o más secuencias reguladoras unidas de forma operativa a la secuencia de ácidos nucleicos a expresar.

Una "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores, y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos, así como secuencias reguladoras y/o inducibles específicas de tejido. El diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de proteína o ARN deseados, y similares. El vector de expresión se puede introducir en células hospedadoras para producir un polipéptido de la presente invención. Un promotor se define como una secuencia de ADN que dirige ARN polimerasa para que se una a ADN e iniciar la síntesis de ARN. Un promotor fuerte es uno que hace que los ARNm se inicien a frecuencia elevada.

Como se ha mencionado anteriormente cualquier polinucleótido o un polinucleótido biológicamente equivalente disponible para el experto con el mismo fin pretendido se puede insertar en un vector de expresión apropiado y se puede unir con otras moléculas de ADN para formar "moléculas de ADN recombinante" que expresan este receptor. Estos vectores pueden estar formados por ADN o ARN; para la mayoría de los fines de clonación son preferentes los vectores de ADN. Los vectores habituales incluyen plásmidos, virus modificados, bacteriófagos y cósmidos, cromosomas artificiales de levadura y otras formas de ADN episómico o integrado. Dentro del alcance del experto está determinar un vector apropiado para un uso en particular.

Para expresar los Fc de IgG que se han mencionado anteriormente se puede usar una diversidad de vectores de expresión de mamíferos. Como se ha indicado anteriormente, los vectores de expresión pueden ser secuencias de ADN que son necesarias para la transcripción de ADN clonado y la traducción de sus ARNm en un hospedador apropiado. Los vectores de ese tipo se pueden usar para expresar ARN eucariota en una diversidad de hospedadores tales como bacterias, algas azules y verdes, células vegetales, células de insecto y células de animal. Los vectores diseñados de forma específica permiten el barajado de ADN entre hospedadores tales como células de bacterias-levadura o bacterias-animal. Un vector de expresión construido de forma apropiada debería contener: un origen de replicación para replicación autónoma en células hospedadoras, marcadores seleccionables, un número limitado de sitios de enzima de restricción útiles, un potencial para que número de copias elevado, y promotores activos. Los vectores de expresión pueden incluir, pero no se limitan a, vectores de clonación, vectores de clonación modificados, plásmidos o virus diseñados de forma específica. Los vectores de expresión de mamífero disponibles en el mercado que pueden ser adecuados incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3.neo (Invitrogen), pcDNA3.1 (Invitrogen), pCI-neo (Promega), pLITMUS28, pLITMUS29, pLITMUS38 y pLITMUS39 (New England Biolabs), pcDNA1, pcDNA1amp (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pXTI (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460), e IZD35 (ATCC 37565).

Dentro del alcance de la presente invención también se encuentra una célula hospedadora que contiene el ácido nucleico que se ha descrito anteriormente. Los ejemplos incluyen células de *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura, o células de mamífero. Véase por ejemplo, Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. Para producir un polipéptido de la presente invención, una célula hospedadora se puede cultivar en un medio en condiciones que permitan la expresión del polipéptido codificado por un ácido nucleico de la presente invención, y purificar el polipéptido de la célula cultivada o del medio de la célula. Como alternativa, el ácido nucleico de la presente invención se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras de promotor T7 y T7 polimerasa 2.

Adicionalmente, se desvela que todos los Fc de IgG que se producen de forma natural, los Fc de IgG modificados por ingeniería genética, y los Fc de IgG sintetizados por vía química, se pueden usar para poner en práctica la invención que se desvela en el mismo. El Fc de IgG obtenido mediante tecnología del ADN recombinante puede tener la misma secuencia de aminoácidos que [FA241] SEQ ID NO: 2) o un equivalente funcional de la misma. La expresión "Fc de IgG" también cubre versiones químicamente modificadas. Los ejemplos de los Fc de IgG químicamente modificado incluyen los Fc de IgG sometidos a cambio de conformación, adición o delección de una

cadena de azúcar, y Fc de IgG a que se ha unido un compuesto tal como polietilenglicol.

La eficacia de un polipéptido/proteína preparados de ese modo se puede verificar usando un modelo animal, tal como un ratón transgénico, como se describe a continuación. Cualquier aumento estadísticamente significativo en la expresión *in vivo* de IL-33 o expresión del receptor FcγRIIB en macrófagos efectoros indica que el polipéptido/proteína es un candidato para el tratamiento de los trastornos que se mencionan a continuación. En una realización, los ensayos que se han descrito anteriormente "se pueden basar en la medición de una unión a proteína DC-SIGN o células DC-SIGN⁽⁺⁾. La técnica está llena de diversas técnicas disponibles para el experto en la materia que serán adecuadas para medir la capacidad de un compuesto con respecto a DC-SIGN o a células DC-SIGN⁽⁺⁾ y cambios relacionados en la expresión de un gen regulado por la ruta de DC-SING, tal como IL-33. El experto en la materia será capaz de mezclar y hacer coincidir estas diversas herramientas de investigación sin experimentación excesiva. Una vez purificadas y sometidas a ensayo mediante métodos convencionales o de acuerdo con los ensayos y métodos que se describen en los ejemplos que siguen a continuación, las variantes de Fc de IgG no sialilada se pueden incluir en la composición farmacéutica para tratar trastornos inflamatorios.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y de forma específica cubre anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada.

Como se usa en el presente documento, los "fragmentos de anticuerpo", pueden comprender una parte de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye en la región variable o de unión a antígenos del anticuerpo intacto la región Fc de un anticuerpo que retiene la capacidad de unión a FcR. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de una sola cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos retienen preferentemente al menos parte de la región bisagra y opcionalmente la región CH1 de una cadena pesada de IgG. Más preferentemente, los fragmentos de anticuerpo retienen toda la región constante de una cadena pesada de IgG, e incluyen una cadena ligera de IgG.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de Fc" o "región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La "región Fc" puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variable. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, normalmente se define que la región Fc de cadena pesada de IgG humana normalmente produce un estiramiento de un resto de aminoácido en la posición Cys226, o de Pro230, con respecto al extremo carboxilo terminal del mismo.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende la secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una "región Fc variable" como observa alguien con una experiencia habitual en la materia comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una "modificación de aminoácido". Preferentemente, la región Fc variable tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con respecto a la región Fc de un polipéptido precursor, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido precursor. En el presente documento la región Fc tendrá preferentemente una homología de al menos aproximadamente un 75 o un 80 % con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido precursor, y más preferentemente una homología de al menos aproximadamente un 90 % con respecto a la misma, más preferentemente una homología de al menos aproximadamente un 95 % con respecto a la misma, incluso más preferentemente, una homología de al menos aproximadamente un 99 % con respecto a la misma.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En una realización de la invención, FcR es un FcR humano de secuencia nativa. En otra realización, FcR, incluyendo FcR humano, se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y como alternativa formas de corte y empalme de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA tiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) en su dominio citoplasmático (de hacer la revisión en Daron, *Annu Rev Immunol*, 15, 203-234 (1997); los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu Rev Immunol*, 9, 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods*, 4, 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J Lab Clin Med*, 126, 330-41 (1995), Nimmerjahn y Ravetch 2006, *Ravetch Fc Receptors in Fundamental Immunology*, ed William Paul 5ª Ed.

El término "nativo" o "precursor" se refiere a un polipéptido no modificado que comprende la secuencia de aminoácidos de Fc. El polipéptido precursor puede comprender una región Fc de secuencia nativa o una región Fc con modificaciones en la secuencia de aminoácidos preexistente (tales como adiciones, deleciones y/o sustituciones).

Composiciones

Dentro del alcance de la presente invención se encuentra una composición que contiene un vehículo adecuado y el polipéptido como se define en las reivindicaciones 1 a 3, o un ácido nucleico como se define en la reivindicación 4.

La composición puede ser una composición farmacéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable o una composición cosmética que contiene un vehículo cosmética en que aceptable.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, que hace que la composición sea especialmente adecuada para diagnóstico opuso terapéutico *in vivo* o *ex vivo*. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable", después de su administración o en un sujeto, no produce efectos fisiológicos indeseables. En la composición farmacéutica el vehículo debe ser "aceptable" también en el sentido en el que es compatible con el principio activo y puede ser capaz de estabilizarla. Uno o más agentes solubilizantes se pueden usar como vehículos farmacéuticos para la administración de un compuesto activo. Los ejemplos de un vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes biocompatibles para conseguir una composición que se puede usar como una forma de dosificación. Los ejemplos de otros vehículos incluyen óxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa y lauril sulfato sódico.

La composición que se ha descrito anteriormente, en cualquiera de las formas que se han descrito anteriormente, se puede usar para tratar trastornos caracterizados por inflamación. Una cantidad eficaz se refiere a la cantidad de un compuesto/agente activo que se necesita para proporcionar un efecto terapéutico en un sujeto tratado. Las dosis eficaces variarán, tal como reconocen las personas con experiencia en la materia, dependiendo de los tipos de enfermedades tratadas, vía de administración, uso de excipiente, y la posibilidad de uso simultáneo con otro tratamiento terapéutico.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía parenteral, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, por vía tópica, o por vía bucal. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, se refiere a inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, o intracraneal, así como cualquier técnica de infusión adecuada.

Una composición inyectable estéril puede ser una solución o suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. Las soluciones de ese tipo incluyen, 1,3-butanodiol, manitol, agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro sódico. Además, de forma convencional se usan aceites no volátiles como un disolvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono- o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que lo son los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, versiones polioxietiladas de los mismos. Estas soluciones o suspensiones oleosas también deben contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga tal como, pero no que no se limita a, carboximetil celulosa, o a agentes de dispersión similares. Otros tensioactivos usados normalmente, tales como TWEENS o SPANS u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad similares, que se usa normalmente en la fabricación de formas de dosificación sólida, líquida o de otro tipo, farmacéuticamente aceptables, también se pueden usar con la finalidad de formulación.

Una composición para administración oral puede ser cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones acuosas, dispersiones, y soluciones. En el caso de comprimidos, los vehículos usados normalmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Generalmente también se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el principio activo se puede suspender o disolver en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, saborizantes, o colorantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración tópica de acuerdo con la invención que se describe se pueden formular como soluciones, pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles, o aceites. Como alternativa, las formulaciones tópicas se pueden presentar en forma de parches o apósitos impregnados con principio o principios activos, que opcionalmente pueden comprender uno o más excipientes o diluyentes. En algunas realizaciones preferentes, las formaciones tópicas incluyen un material que podría aumentar la absorción o penetración del agente o agentes activos a través de la piel u otras zonas afectadas. La composición tópica es útil para tratar trastornos inflamatorios en la piel, incluyendo eccema, acné, rosácea, psoriasis, dermatitis por contacto, y reacciones a veneno de hiedra.

Una composición tópica contiene una cantidad segura y eficaz de vehículo dermatológicamente aceptable adecuado para aplicación a la piel. Una composición o componente "cosméticamente aceptable" o "dermatológicamente aceptable" se refiere a una composición o componente que es adecuado para su uso en contacto con la piel humana sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, excesivas, y similares. El vehículo permite la administración de un agente activo y componente opcional a la piel a una concentración o concentraciones apropiadas. Por lo tanto, el vehículo puede actuar como un diluyente, dispersante, disolvente, o similar, para

garantizar que los materiales activos se apliquen a y se distribuyan uniformemente sobre la diana seleccionada a una concentración apropiada. El vehículo puede ser sólido, semisólido, o líquido. El vehículo puede estar en forma de una loción, una crema, o un gel, en particular algo que tenga un espesor o fluencia suficientes para evitar que los materiales activos sedimenten. El vehículo puede ser inerte o tener beneficios dermatológicos. También podría ser física y químicamente compatible con los componentes activos que se describen en el presente documento, y no debería alterar de forma excesiva la estabilidad, eficacia, u otros beneficios de uso asociados con la composición. La composición tópica puede ser un producto cosmético o dermatológico en la forma conocida en la técnica para aplicaciones tópicas o transdérmicas, incluyendo soluciones, aerosoles, cremas, geles, parches, pomada, loción, o espuma.

Métodos de Tratamiento

La descripción proporciona métodos para tratar en un trastorno inflamatorio en un sujeto. La expresión "trastorno inflamatorio" se refiere a un trastorno que se caracteriza por inflamación anómala o no deseada, tal como una enfermedad autoinmune. Las enfermedades autoinmunitarias son trastornos caracterizados por la activación crónica de células inmunes en condiciones no activantes. Los ejemplos incluyen psoriasis, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), artritis reumatoide, artritis psoriática, esclerosis múltiple, lupus, diabetes de tipo I, cirrosis biliar primaria, y trasplante.

Otros ejemplos de trastornos inflamatorios que se pueden tratar con los métodos de la descripción incluyen asma, infarto de miocardio, apoplejía, dermatosis inflamatorias (por ejemplo, dermatitis, eccema, dermatitis atópica, dermatitis por contacto alérgica, urticaria, vasculitis necrotizante, vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, miositis eosinofílica, polimiositis, dermatomiositis, y fascitis eosinofílica), síndrome de distrés respiratorio agudo, hepatitis fulminante, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad (por ejemplo, neumonitis por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, hipersensibilidad de tipo retardado, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), fibrosis pulmonar idiopática, e ILD asociada con artritis reumatoide), y rinitis alérgica. Los ejemplos adicionales también incluyen miastenia gravis, diabetes de inicio juvenil, glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, enfermedades inflamatorias agudas y crónicas (por ejemplo, anafilaxis sistémica o respuestas por hipersensibilidad, alergias farmacológicas, alergias por picadura de insecto, rechazo de aloinjerto, y enfermedad de injerto contra hospedador), y síndrome de Sjogren.

Un "sujeto" se refiere a un ser humano y un animal no humano. Los ejemplos de un animal no humano incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como mamíferos no humanos, primates no humanos (en particular primates superiores), perro, roedor (por ejemplo, ratón o rata), cobaya, gato, y conejo, y no mamíferos, tales como aves, anfibios, reptiles, etc. En una realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un animal no humano, experimental o animal adecuado como un modelo de enfermedad.

Un sujeto que se va a tratar para un trastorno inflamatorio se puede identificar mediante técnicas de diagnóstico convencionales para el trastorno. Opcionalmente, el sujeto se puede examinar con respecto al nivel o porcentaje de una o más de citoquinas o células de una muestra de ensayo obtenida del sujeto mediante métodos conocidos en la técnica. Si el nivel o porcentaje está a, o por debajo de, un valor umbral (que se puede obtener de un sujeto normal), el sujeto es un candidato para el tratamiento que se describe en el presente documento. Para confirmar la inhibición o tratamiento, se puede evaluar y/o verificar el nivel o porcentaje de una o más de las citoquinas o células que se han mencionado anteriormente en el sujeto después de tratamiento.

"Tratar" o "tratamiento" se refiere a la administración de un compuesto o agente a un sujeto que tiene un trastorno con el fin de curar, aliviar, mitigar, remediar, retrasar el inicio de, prevenir, o mejorar el trastorno, es síntoma del trastorno, la patología secundaria al trastorno, o la predisposición hacia el trastorno.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto o agente que es capaz de producir un resultado médicamente deseable en un sujeto tratado. El método de tratamiento se puede realizar *in vivo* o *ex vivo*, solo buen conjunto con otros fármacos o terapia. Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no se pretende que se limite a una formulación o vía de administración en particular.

El agente se puede administrar *in vivo* o *ex vivo*, solo o administrado de forma simultánea en conjunto con otros fármacos o terapia, es decir, una terapia de cóctel. Como se usa en el presente documento, la expresión "administración simultánea" o "administrado de forma simultánea" se refiere a la administración de al menos dos agentes o terapias a un sujeto. En algunas realizaciones, la administración simultánea de dos o más agentes/terapias es simultánea. En otras realizaciones, un primer agente/terapia se administra antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en la materia entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes/terapias usadas pueden variar.

En un enfoque *in vivo*, un compuesto o agente se administrar a un sujeto. Generalmente, el compuesto o agente se suspende en un vehículo farmacéuticamente aceptable (tal como, por ejemplo, pero no limitado a, solución salina fisiológica) y se administra por vía oral o mediante infusión intravenosa, o se inyecta o se implanta por vía

subcutánea, por vía intramuscular, por vía intratecal, por vía intraperitoneal, por vía intrarrectal, por vía intravaginal, por vía intranasal, por vía intragástrica, por vía intratraqueal, o por vía intrapulmonar.

La dosificación requerida depende de la elección de la vía de administración; la naturaleza de la formulación; la naturaleza de la enfermedad del paciente; el tamaño, peso, área superficial, edad y sexo del sujeto; otros fármacos que se estén administrando; y el criterio del médico que prescribe. Las dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,01-100 mg/kg. En vista de la diversidad de compuestos/agentes disponibles y las diferentes eficacia es de diversas vías de administración se pueden esperar variaciones en la dosificación necesaria. Por ejemplo, se podría esperar que la administración oral necesitara dosificaciones más elevadas que la administración mediante inyección i.v. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas empíricas convencionales para optimización tal como se entiende bien en la técnica. La encapsulación del compuesto en un vehículo de administración adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) pueden aumentar la eficacia de la administración con en particular para administración oral.

Ejemplo 1: Métodos y Materiales

Este ejemplo describe métodos y materiales generales usados en los Ejemplos 2-7.

Ratones

Los ratones C57BL/6 de tipo silvestre se adquirieron en Jackson Laboratories. Los ratones SIGNR1^{-/-} fueron proporcionados por A. McKenzie. Los ratones transgénicos CD11c-DC-SIGN⁺ fueron proporcionados por T. Sparwasser. Los ratones transgénicos hDC-SIGN BAC con un antecedente de SIGNR1^{-/-} se generaron en el laboratorio de los inventores como se ha descrito anteriormente. Los ratones KRN TCR C57BL/6 (presentes de D. Mathis y C. Benoist) se cruzaron con ratones NOD para generar ratones K/BxN. La sangre de los ratones K/BxN (6-12 semanas de edad) se extrajo y el suero que contenía anticuerpos artríticos se combinó en conjunto. La transferencia pasiva de 200 µl de suero de K/BxN mediante inyección i.v. a ratones sin tratamiento previo (8-12 semanas de edad) indujo artritis. La inflamación se puntuó de 0-3 para cada pata y se añadió en conjunto para una puntuación clínica total por ratón individual.

Preparación de Fc recombinante

IDEC-114, una fuente recombinante de anticuerpo monoclonal de IgG1 humana de longitud completa, se digirió con papaína durante una noche a 37 °C para escindir los fragmentos de Fab y Fc. Después de la digestión, la reacción se detuvo mediante la adición de 2,5 mg/ml de yodoacetamida. Para separar los fragmentos escindidos del anticuerpo sin digerir, se hicieron pasas de las muestras sobre una columna de exclusión por tamaño HiPrep 26/60 S-200HR (GE HEALTHCARE). El fragmento de Fc se purificó posteriormente con perlas de agarosa con proteína G. La pureza de la muestra se verificó mediante tinción de geles de SDS-poliacrilamida con azul brillante de Coomassie. Como alternativa, los Fc recombinantes se produjeron mediante transfección transitoria de plásmidos que expresan Fc de IgG1 humana en células 293T seguido de precipitación con sulfato de amonio de fracciones de sobrenadante y purificación de proteína G. La secuencia genética que codifica la región Fc de la IgG1 humana se amplificó a partir de 4-4-20 de IgG1 mediante protocolos convencionales de PCR y se ligó en pSecTag2 (INVITROGEN). Se introdujeron mutaciones puntuales en la secuencia codificante de Fc mediante técnicas convencionales de mutagénesis dirigida al sitio y se verificó mediante secuenciación de ADN. Los cebadores de PCR para la sustitución de Phe por Ala en la posición 241 (FA241) fueron

5'-ggggaccgtcagtcgccctcttcccccaa-3' (SEQ ID NO: 4) y

5'-ttgggggaagagggcgactgacgggtcccc-3' (SEQ ID NO: 5).

La expresión y la pureza de la proteína se confirmaron por inmunotransferencia con anticuerpos de Fc anti-humano y/o tinción de geles de SDS-poliacrilamida con azul brillante de Coomassie.

Reacción de sialilación in vitro en dos etapas

Después de la purificación, se hizo intercambio de tampón en 10-50 mg/ml de fragmentos de Fc por un tampón de reacción de galactosilación (MOPS 50 mM, pH 7,2; MnCl₂ 20 mM) y se incubaron durante una noche a 37 °C con 50 mg de UDP-galactosa y 0,75 U de β1,4-galatosiltransferasa. La galactosilación se confirmó mediante transferencias puntuales de lectina usando ECL para reconocer restos de galactosa terminales. A continuación se hizo un intercambio del tampón de los Fc galactosilados en por un tampón de reacción de sialilación (MOPS 100 mM, 0,2 mg/ml de BSA, Triton X-100 al 0,5 %, pH 7,4) y se incubó durante una noche a 37 °C con 50 mg de CMP-ácido siálico y 0,75 U de α2,6-sialiltransferasa. La sialilación se confirmó mediante transferencias puntuales de lectina usando SNA para reconocer restos de ácido siálico terminales con una unión α2-6.

Transferencia adoptiva de macrófagos obtenidos a partir de médula ósea

Las células de médula ósea se lavaron abundantemente a partir de tibias y fémures de ratones DC-SIGNtg o

SIGNR1⁺, y se sembraron en placas de 10 cm tratadas con cultivo no tisular en medio de crecimiento RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %, Pen/Estrep al 1 %, IL-3 (5 ng/ml, PEPROTECH), y M-CSF (5 ng/ml, PEPROTECH). Después de una incubación durante una noche a 37 °C, las células no adherentes se recuperaron y se transfirieron a placas de 10 cm tratadas con cultivo no tisular con medio de crecimiento RPMI suplementado con IL-3/M-CSF, y se cultivó durante 5-7 días a 37 °C. Los macrófagos maduros se tripsinizaron y se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 2×10^6 células/pocillo, y se permitió que se unieran durante una noche. Al día siguiente los macrófagos se pulsaron con la preparación indicada de Fc recombinante durante 30 min a 37 °C. Las células se recuperaron, se lavaron con PBS frío, y se administraron 1×10^6 por vía i.v. a ratones C57BL/6 de tipo silvestre. Una hora después de la inyección, los ratones receptores se estimularon con sueros de K/BxN.

Expresión y purificación de DC-SIGN humano soluble

K. Drickamer proporcionó un plásmido que contenía la secuencia de ADNc del dominio extracelular (ECD) de DC-SIGN humano. La secuencia codificante para ECD de DC-SIGN se modificó para introducir una etiqueta de estrep N-terminal mediante técnicas convencionales de PCR y se ligó a pET28b(+). pET28b-estrepDCSIGN se transformó en la cepa BL21/DE3 de *E. coli* y se cultivó en 3 l de medio de crecimiento de TB a 37 °C hasta que el cultivo bacteriano alcanzó una DO₆₀₀ de 0,7-0,8. La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de 100 mg/l de IPTG y los cultivos se incubaron a 37 °C durante 3,5 h. Las bacterias se alimentaron por centrifugación a 4000 x g durante 10 min a 4 °C. Los sedimentos bacterianos se volvieron a suspender en Tris-HCl 10 mM, pH 7,8, y se lisaron mediante sonicación. Los cuerpos de inclusión se sedimentaron mediante centrifugación a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C y se solubilizaron en 100 ml de guanidina-HCl 6 M; Tris-HCl 100 mM, pH 7,8; TRITON X-100 al 0,2 %. Las partículas de materia se retiraron por centrifugación a 20.000 x g durante 30 min a 4 °C, y la fracción de sobrenadante se dializó contra NaCl 250 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 7,8; CaCl₂ 25 mM. Después de diálisis, los precipitados insolubles se retiraron por centrifugación a 20.000 x g durante 30 min a 4 °C, y la fracción de sobrenadante se aplicó a una resina Strep-Tactin (NOVAGEN) para captar ECD de DC-SIGN etiquetado con estrep. Las proteínas unidas se eluyeron a partir de resina con tampón de elución suministrado por el fabricante (NOVAGEN). Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y las fracciones positivas se combinaron y se cargaron sobre una columna de manosa-agarosa para seleccionar los receptores activos. Es ECD de DC-SIGN se eluyó con NaCl 250 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 7,8; EDTA 5 mM. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE.

Resonancia de plasmón superficial

Para determinar la interacción entre diversas preparaciones de Fc recombinante con respecto a hDC-SIGN soluble o los hFcγR, las mediciones de afinidad en estado estacionario se registraron en un sensor T100 de Biacore. Los receptores diluidos a 20-50 µg/ml en NaOAc a pH 5,0, se inmovilizaron sobre chips de CM5 a una densidad elevada (2000 UR) mediante acoplamiento de amina convencional. Para interacciones de hDC-SIGN, las inyecciones se realizaron a un caudal de 20 µl/min con tampón HBS-P+ disponible en el mercado ajustado a pH 9,0 y suplementado con CaCl₂ 2 mM y NaCl 500 mM. Para interacciones de hFcγR, las inyecciones se realizaron a un caudal de 20 µl/min con tampón HBS-EP+ disponible en el mercado. Las superficies se regeneraron con pulso corto de NaOH 50 mM. Los valores de K_d se calcularon después de restar la unión de fondo a una célula de flujo de control usando el software de Evaluación de Biacore.

RT-PCR

El ARN total se extrajo de macrófagos obtenidos a partir de médula ósea usando el kit RNeasy Mini (QIAGEN). Un microgramo de ARN total se usó para analizar la expresión del ARNm de IL-33 por RT-PCR usando el kit de RT-PCR OneStep (QIAGEN). La expresión de GAPDH sirvió como un control de carga. Los cebadores de PCR para mL-33 fueron 5'-gaagatccaacagaagacc-3' (SEQ ID NO: 6) y 5'-ttccggaggcgagacgtcac-3'(SEQ ID NO: 7); y para mGAPDH fueron 5'-gccgcctggagaaacctgc-3' (SEQ ID NO: 8) y 5'-tgaggtccaccaccctgttg-3' (SEQ ID NO: 9). Las condiciones de PCR fueron 94 °C durante 30 s; 55 °C durante 30 s; 72 °C durante 60 s x 35 ciclos (IL-33) o 25 ciclos (GAPDH).

Ejemplo 2: el ácido siálico unido en α2,6 proporcionó actividad de unión de DC-SIGN a Fc de IgG1 humana recombinante

Una población secundaria de anticuerpos en preparaciones de IVIG suprime la inflamación inducida por autoanticuerpo. Estos anticuerpos, que contenían ácido siálico unido en la posición α2,6 terminal en el glicano de Fc, median una respuesta antiinflamatoria mediante unión a SIGNR1 sobre macrófagos de zona marginal o su ortólogo humano, DC-SIGN, en células mieloides.

Para estudiar la interacción de sFc con respecto a DC-SIGN, una forma soluble del dominio extracelular de DC-SIGN (ECD de DC-SIGN) se purificó a partir de bacterias y se inmovilizó sobre chips de CM5. sFc se preparó a partir de anticuerpos IDEC-114 de longitud completa y se sialiló *in vitro* (Figura 1b), y se unió de forma específica a la superficie conjugada con DC-SIGN- (Figura 1a). Se realizaron mediciones de afinidad en estado estacionario y el valor de K_D para esta interacción se calculó como $\sim 1,3 \times 10^{-6}$ M (Figura 1c). Por el contrario, una glicofoma asialilada de Fc de IDEC-114 no mostró actividad de unión a DC-SIGN lo que sugiere que la sialilación induce un

cambio de conformación en la estructura principal de Fc para desvelar un sitio de unión a DC-SIGN.

Como se muestra en la Figura 1a, se encontró que el $\alpha 2,6$ -sFc recombinante se une a DC-SIGN soluble tal como se mide mediante resonancia por plasmón superficial (SPR). Los Fc se prepararon mediante escisión con papaína de anticuerpo de IgG1 monoclonal humano de longitud completa (IDEC-114) seguido por reacciones de galactosilación y sialilación *in vitro*. Los sensogramas de SPR para unión de anticuerpo a DC-SIGN inmovilizado se muestran para glicoformas sialiladas y galactosiladas de los Fc de hIgG1 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Se encontró que las concentraciones de Fc fluctuaban sobre el intervalo de ECD de DC-SIGN de 3-0,8 μ M. Como se muestra en la Figura 1b, la transferencia puntual de lectina con SNA confirmó la unión de ácido siálico con unión en 2,6 sobre Fc (panel de la parte superior); los controles de carga teñidos con Coomassie se mostraron en el panel de la parte inferior. La medición de K_D en el estado estacionario de la unión de sFc a DC-SIGN (como se muestra en a.) se calculó mediante el software de Evaluación de Biacore.

Ejemplo 3 las mutaciones que interrumpen las interacciones de Fc-glicano transmitieron actividad de unión de DC-SIGN a Fc de IgG1 humana recombinante

La cadena de oligosacárido núcleo unido a Asn²⁹⁷ proporciona interacciones no covalentes amplias con la estructura principal de aminoácidos del Fc. Los cambios conformacionales en el Fc de inducidos por diferentes restos de azúcar unidos al glicano núcleo están mediados por estas interacciones de proteína-carbohidrato. Parece que las sustituciones de alanina que erradican los puntos de contacto fundamentales entre la estructura principal de Fc y los restos de glicano proporcionan una actividad de unión a DC-SIGN.

Como se muestra en la Figura 2A, las mutaciones FA241 y FA243 presentan actividad de unión a DC-SIGN sin procesamiento enzimático *in vitro*. Los valores de K_D aparentes varían de 6×10^{-7} M para FA241 a 3×10^{-7} M para FA243. Los informes previos indican que estas mutaciones aumentan la sialilación de anticuerpos, supuestamente por hacer que el glicano sea más accesible para glicosiltransferasas, cuando se expresan en células de mamífero. Para verificar esto, una transferencia puntual de lectina se realizó para determinar si la unión de FA241 y FA243 a DC-SIGN se debe al aumento de la sialilación de proteínas expresadas de forma transitoria. Como se muestra en la Figura 2B, las transferencias puntuales de SNA no detectaron restos de ácido siálico terminales en FA241 y FA243 purificados lo que indica que la interacción con DC-SIGN era independiente de la modificación de ácido siálico.

De forma más específica, los restos F241, F243, D265, y R301 junto con la estructura principal de aminoácido de Fc de IgG1 se sustituyeron con alanina para interrumpir las interacciones no covalentes con restos de oligosacárido. Los Fc se expresaron y se purificaron a partir de células 293T y se analizaron para actividad de unión a DC-SIGN con resonancia de plasmón superficial como se ha descrito anteriormente. Se encontró que los Fc que portaban mutaciones FA241 o FA243 presentaban un aumento de la afinidad hacia DC-SIGN con respecto mediciones de afinidad para sFc (Figura 1a). Las transferencias puntuales de lectina con ECL (Figura 1b, panel de la parte media) y SNA (panel de la parte superior) se realizaron para determinar restos de azúcar terminales en los Fc purificados a partir de células 293T. Como un control positivo para los Fc sialilados, FA241 se sialiló *in vitro* como se describe en la Figura 1a. Los controles de carga teñidos con Coomassie se muestran en el panel de la parte inferior de la Figura 1b.

Ejemplo 4 La mutación FA241 en Fc de hIgG1 sintetizó la actividad antiinflamatoria de sFc en $\alpha 2,6$

Para ver si las mutaciones FA241 y FA243 imitan la actividad de unión a DC-SIGN de sFc, se realizaron ensayos para examinar si estas mutaciones se podrían replicar en la actividad antiinflamatoria de sFc *in vivo*. Los ratones SIGNR1^{-/-} y hDC-SIGN⁺/SIGNR1^{-/-} emparejados por edad y sexo se estimularon con sueros de K/BxN artrítico y se trataron con sFc, FA241, o FA243 a una dosis eficaz de 0,033 g/kg. De acuerdo con los hallazgos previos, sFc suprimió la hinchazón de la almohadilla plantar en ratones DC-SIGN⁺ pero no en ratones SIGNR1^{-/-}.

De forma análoga, FA241 demostró una actividad antiinflamatoria comparable a la de sFc en ratones hDC-SIGN⁺/SIGNR1^{-/-}. Los ratones a los que se les administra FA243 no mostraron reducción de la inflamación en la articulación. Estos hallazgos sugieren que los Fc recombinantes que portan una mutación F241A (FA241) sintetiza la unión a DC-SIGN y la actividad antiinflamatoria de sFc en ausencia de modificación con ácido siálico.

Como se muestra en la Figura 3, a los ratones hDC-SIGN⁺/SIGNR1^{-/-} (cuadrados de color blanco) y SIGNR1^{-/-} (cuadrados de color negro) se les administraron 0,7 mg/ratón de sFc, FA241, o FA243 mediante inyección i.v. Los ratones estimularon posteriormente con sueros de K/BxN 1 h más tarde. La hinchazón de la almohadilla plantar se controló y se puntuó durante varios días. Como se ha informado anteriormente, la actividad antiinflamatoria de sFc depende de DC-SIGN (panel de la parte izquierda). FA241 también suprimió la inflamación artrítica en ratones estimulados con K/BxN de una manera dependiente de DC-SIGN. FA243 no redujo la hinchazón de la almohadilla plantar de forma significativa el día 6. Las medias y ETM de puntuaciones clínicas de 4-5 ratones por grupos se representan en el Día 6.

Ejemplo 5 Requisitos de caracterización para actividad antiinflamatoria de FA241

Para identificar los determinantes de la actividad antiinflamatoria de FA241, los macrófagos obtenidos a partir de médula ósea (BMMΦ) de ratones CD11c.DC-SIGN⁺ y SIGNR1^{-/-} se estimularon con FA241 u otras preparaciones de Fc y se transfirieron a ratones receptores C57BL/6 de WT estimulados con sueros de K/BxN.

- 5 En resumen, los macrófagos obtenidos a partir de médula ósea de ratones CD11c.DC-SIGN⁺ y SIGNR1^{-/-} se cultivaron en IL-3 (5 ng/ml) y M-CSF (5 ng/ml) durante 5-7 días. Como se muestra en la Figura 4, los BMMΦ de DC-SIGN se cursaron con 0,5 mg/ml de glicoformas asialiladas (barras de color negro) o sialiladas (barras de color blanco) de preparaciones de Fc indicadas. Los BMMΦ tratados con se transfirieron a ratones receptores C57BL/6 de WT seguido por estimulación con K/BxN. Como se muestra en la Figura 4b, los BMMΦ de SIGNR1^{-/-} (barras de color negro) y DC-SIGN⁺ (barras de color blanco) se expulsaron con 0,5 mg/ml de la preparación de Fc indicada y se transfirieron a ratones receptores C57BL/6 de WT seguido por estimulación con K/BxN. De forma análoga, los BMMΦ de DC-SIGN⁺ se pulsaron con cualquiera de 0,5 mg/ml de FA241 o FA241 desglucosilado (Figura 4c, barras de color blanco) o PBS (Figura 4c, barra de color negro) y se transfirieron a ratones receptores C57BL/6 de WT seguido por estimulación con K/BxN. FA241 se desglucosiló con PNGasa F y la eliminación de glicano se confirmó mediante transferencia puntual de lectina. Los BMMΦ de DC-SIGN⁺ se pulsaron con la preparación de Fc asialilado indicado o PBS (Figura 4d, círculo de color negro) y se transfirieron a ratones receptores C57BL/6 de WT seguido por estimulación con K/BxN. En todos los casos, la hinchazón de la almohadilla plantar se supervisó y se puntuó durante varios días. Se representan las medias y ETM de las puntuaciones clínicas de 4-5 ratones por grupo. *P < 0,05, como se determina mediante un análisis de ensayo de varianza (ANOVA), seguido de un ensayo de Tukey *a posteriori*.

- Como se muestra en la Figura 4A, las preparaciones de FA241 asialilado o sialilado fueron igualmente eficaces para suprimir la inflamación de la articulación en comparación con sFc. Las preparaciones de Fc de WT, sin embargo, necesitaron ácido siálico unido en α2,6 ya que los BMMΦ de DC-SIGN⁺ expulsados con Fc de WT asialilado no transferían protección a ratones receptores. De acuerdo con los resultados que se muestran en la Figura 3, tanto sFc como FA241 necesitaron expresión de DC-SIGN en BMMΦ para transferir protección (Figura 4B). Aunque FA241 no requiere ácido siálico para transferir protección, la desglucosilación con PNGasa F anuló las propiedades anti inflamatorias de FA241 (Figura 4C) lo que sugiere que el glicano de Fc todavía es necesario. Además, para mostrar que la actividad antiinflamatoria observada es específica para la mutación F241A, los BMMΦ de DC-SIGN⁺ se expulsaron con los Fc que portaban mutaciones alternativas que no transmitían un aumento de la unión a DC-SIGN. Solamente los BMMΦ estimulados con FA241 protegieron a los ratones receptores estimulados con K/BxN.

Ejemplo 6 La mutación FA241 aumento de la unión al receptor Fcγ

- 35 Si una sustitución de alanina en la posición 241 induce un cambio de conformación en el Fc, entonces quizá a la afinidad hacia receptores Fcγ humanos se alterará. Anteriormente se informó de que la sialilación reduce la afinidad de las IgG hacia los FcγR, atenuando en consecuencia la actividad de ADCC *in vivo*.

- Los Fc de IgG1 recombinante que se unen a los FcγR solubles se midió mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Los Fc se prepararon de la forma que se ha descrito anteriormente. Los sensogramas de SPR para unión de anticuerpo a hFcγRIIA_{131R} y hFcγRIIB inmovilizados se muestran en la Figura 5 para glicoformas asialiladas y sialiladas de Fc de hIgG1 de WT y para de Fc FA241 asialilado.

- 45 Como se muestra en la Figura 5, las glicoformas asialiladas de Fc de WT se unieron a hFcγRIIA y RIIB con un valor de K_D observado de ~2-3 x 10⁻⁵ M. Sin embargo, no parecía que sFc se uniera a cualquiera de hFcγRIIA o RIIB. De forma sorprendente, parece que FA241 se une tanto a hFcγRIIA como a RIIB con un orden de magnitud de afinidad más elevada (K_D = ~2 x 10⁻⁶ M).

Ejemplo 7 Inducción de ARNm de IL-33 en macrófagos obtenidos a partir de médula ósea por FA241

- 50 Los sFc inducen una ruta antiinflamatoria dependiente de T_H2 que requiere secreción de IL-4 a partir de una población de leucocitos FcεRI⁺, probablemente basófilos, para regular de forma positiva FcγRIIB en macrófagos reguladores. La administración de IL-33 *in vivo* o *in vitro* estimula los basófilos para liberar reservas de IL-4. La expresión del ARNm de IL-33 se regula de forma positiva en vasos de ratones C57BL/6 de WT tratados con sFc o IVIG, pero no en ratones SIGNR1^{-/-}. Esto sugiere que los sFc pueden inducir la expresión de IL-33 en células SIGNR1⁺ o DC-SIGN⁺. En este ejemplo, los ensayos se realizaron y muestran que parece que la estimulación de los BMMΦ de DC-SIGN⁺ con FA241 regula de forma positiva la expresión de IL-33.

- De forma más específica, los macrófagos obtenidos a partir de médula ósea de ratón es CD11c.DC-SIGN⁺ y SIGNR1^{-/-} se cultivaron de la forma que se ha descrito anteriormente. Los BMMΦ se sembraron en placas de 12 pocillos en medio RPMI sin suero y se permitió que se adhirieran durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, las células se pulsaron con 0,5 mg/ml del Fc indicado en medio RPMI sin suero durante 1 h (Figura 6a.) o 4 h (Figura 6b.) a 37 °C. El ARNm se cosechó a partir de células en momentos especificados y se usó 1 μg de ARN total para amplificación de ARNm de IL-33 por RT-PCR (paneles de la parte superior). La amplificación por GAPDH sirvió como un control de carga (paneles de la parte inferior). El Fc de DA265 y la sialiltransferasa humana (ST6Ga11) que expresan plásmido de forma simultánea se transfectar unen células 293T proporcionando rendimiento de Fc

recombinante altamente sialilado (ST6-DA265).

Como se muestra en la Figura 6, parece que la estimulación de los BMM Φ de DC-SIGN⁺ con FA241 regula de forma positiva la expresión de IL-33. A pesar de los niveles de expresión basales más elevados de IL-33 en comparación con los BMM Φ de DC-SIGN⁺, los BMM Φ de SIGNR1^{-/-} regularon de forma negativa la expresión del ARNm de IL-33 como respuesta al tratamiento con FA241.

El ejemplo y la descripción de las realizaciones preferentes que se han mencionado anteriormente se deberían tomar como ilustrativos, en lugar de limitantes de la presente invención tal como se define con las reivindicaciones.

Listado de secuencias

<110> The Rockefeller University
Ravetch, Jeffrey V
Pincetic, Andrew

<120> POLIPÉPTIDOS ANTIINFLAMATORIOS NO SIALILADOS

<130> RU1062/070413.20147

<140> PCT/US TBD
<141> 04-12-2012

<150> US 61/577.361
<151> 19-12-2011

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 238
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

<210> 2
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutante de FA241

<400> 2

5

```

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

```

ES 2 692 539 T3

115	120	125
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
130	135	140
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
145	150	155
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
165	170	175
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
180	185	190
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
195	200	205
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
210	215	220
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	235

<210> 3
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Mutante de FA243

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 30
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
5	<400> 4	
	ggggacogtc agtcggccctc ttccccccaa	30
10	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 5	
	ttggggggaa gagggcgact gacgggtcccc	30
20	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	gaagatccca acagaagacc	20
30	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de PCT	
	<400> 7	
	ttccggaggc gagacgtcac	20
40	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 8	
	gccgcctgga gaaacctgc	19
50	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 9	
	tgaggtccac caccctgttg	20
60		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia modificada que comprende la SEQ ID NO: 2, en la que la secuencia modificada no está sialilada y el polipéptido tiene una actividad antiinflamatoria que es más elevada que la de un polipéptido sialilado precursor que comprende la SEQ ID NO: 1; y en la que el polipéptido aislado tiene una capacidad para unirse a DC-SIGN, hFcγRIIA, y RIIB.
- 10 2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en la que el polipéptido aislado tiene una capacidad para unirse a hFcγRIIA o RIIB a una K_D de 2×10^{-5} M o inferior (es decir, K_A de $5,0 \times 10^4$ M⁻¹ o superior).
3. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 o 2, en la que la secuencia modificada consiste en la SEQ ID NO: 2.
- 15 4. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Un vector de expresión o una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 4.
- 20 6. Un método para producir un polipéptido, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 5 en un medio en condiciones que permitan la expresión de un polipéptido codificado por el ácido nucleico, y purificar el polipéptido de la célula cultivada o del medio de la célula.
7. Una formulación farmacéutica que comprende (i) el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o un ácido nucleico de la reivindicación 4, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 8. Un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o un ácido nucleico de la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

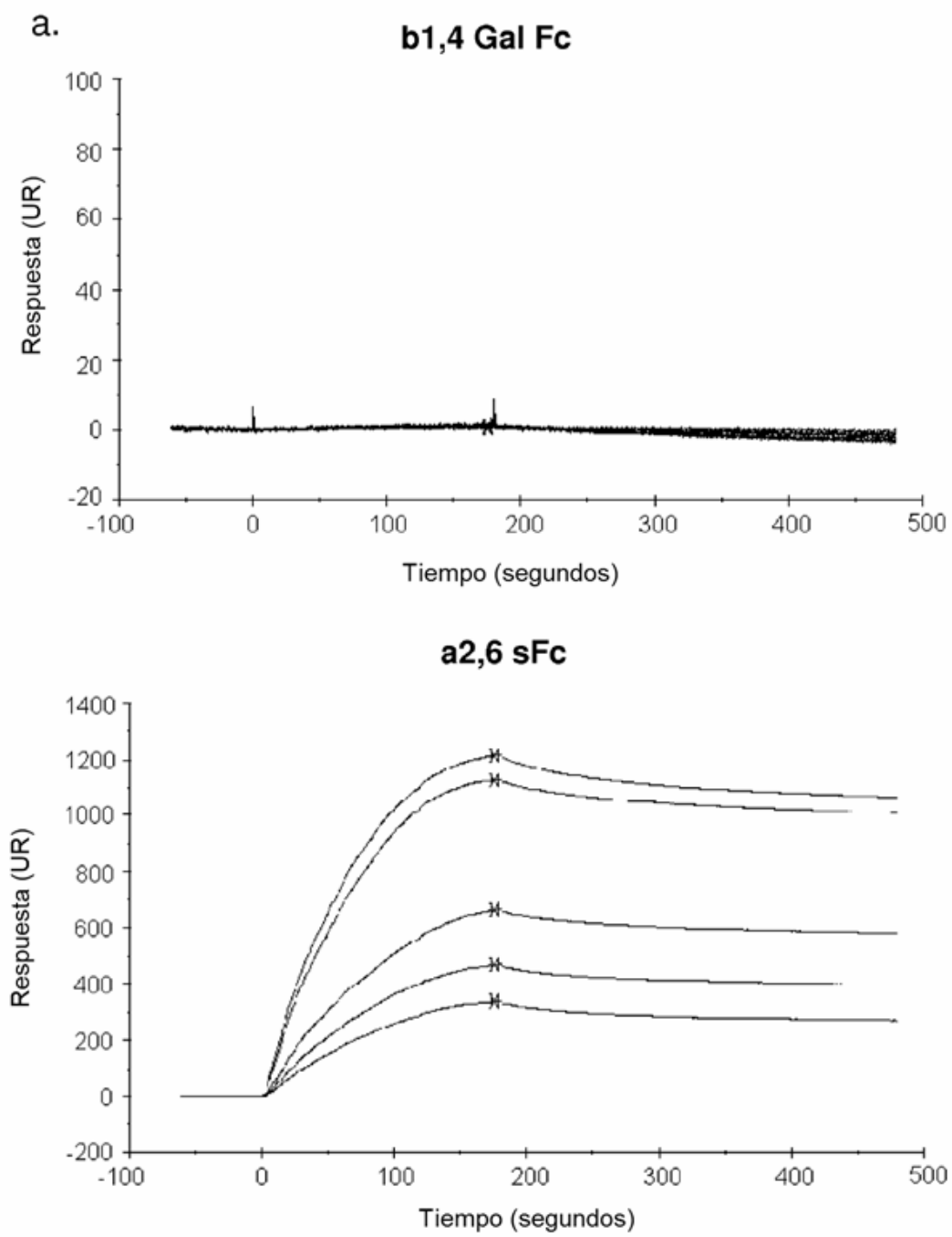
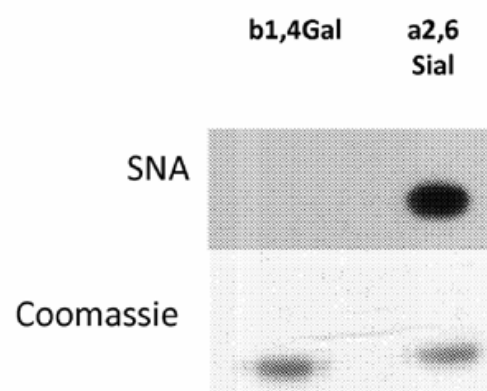
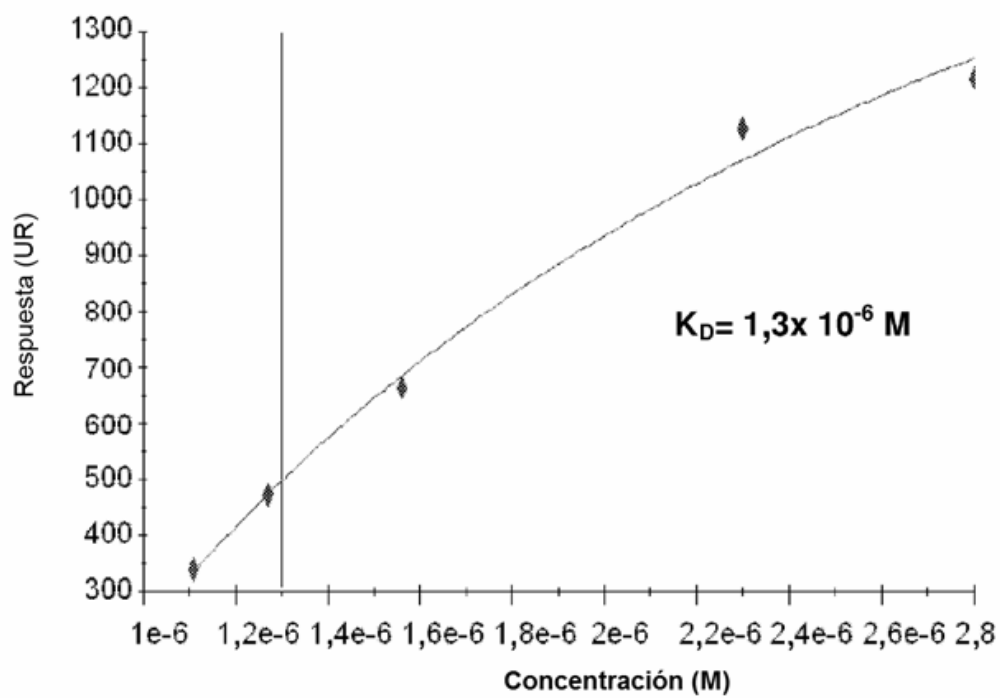


FIGURA 1A

b.



c.



FIGURAS 1 B-C

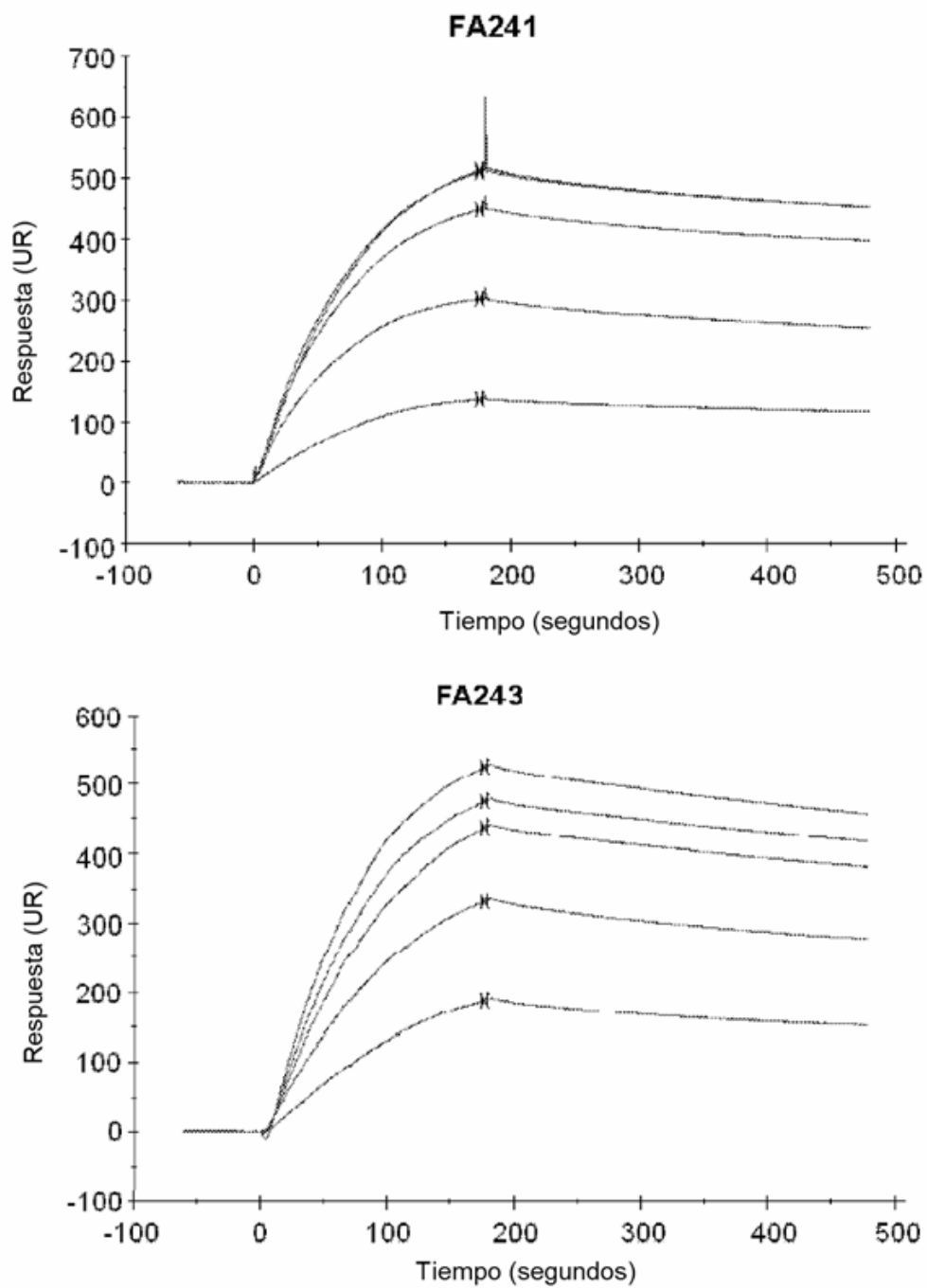


FIGURA 2 A

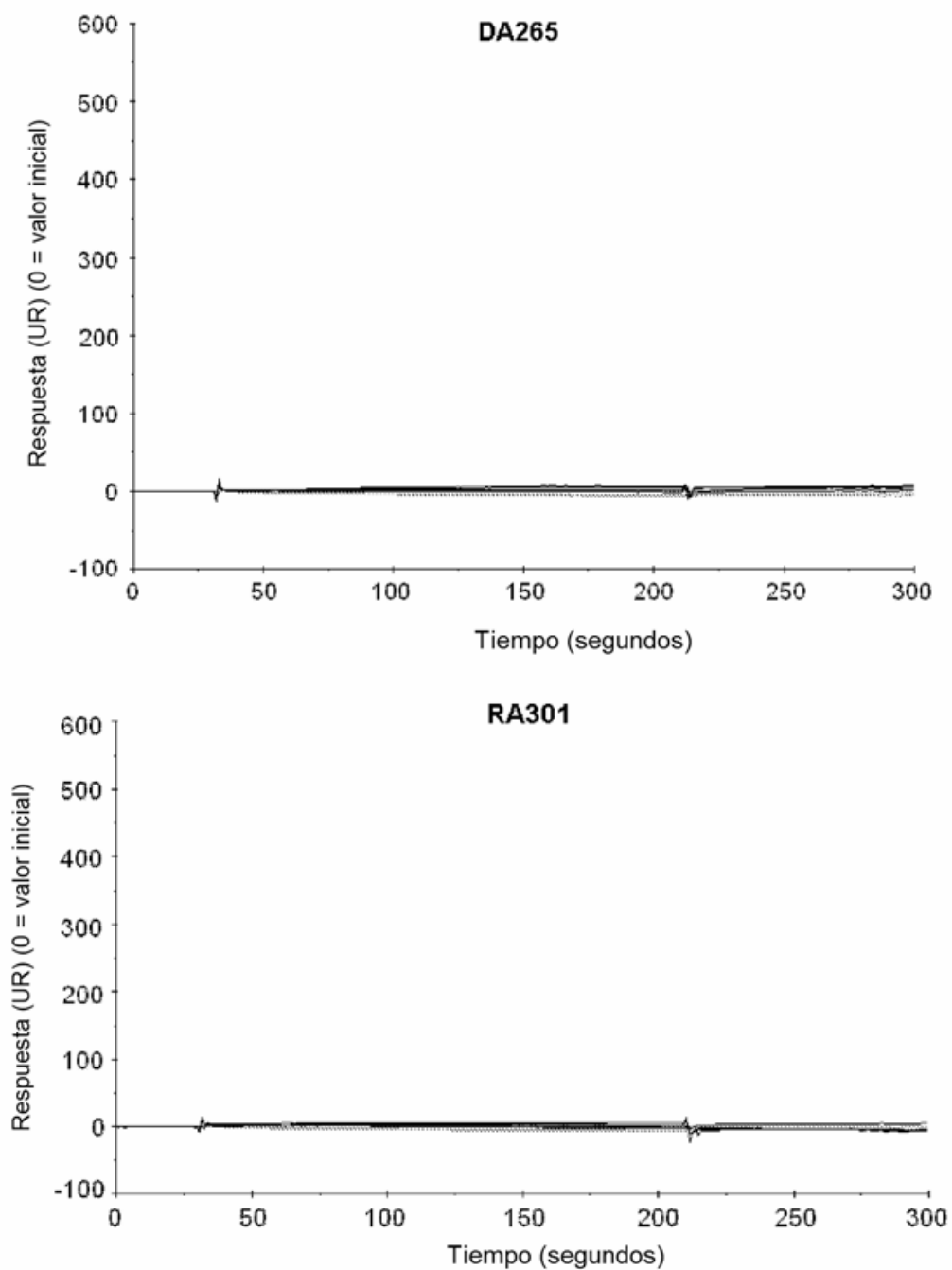


FIGURA 2 A Continuación

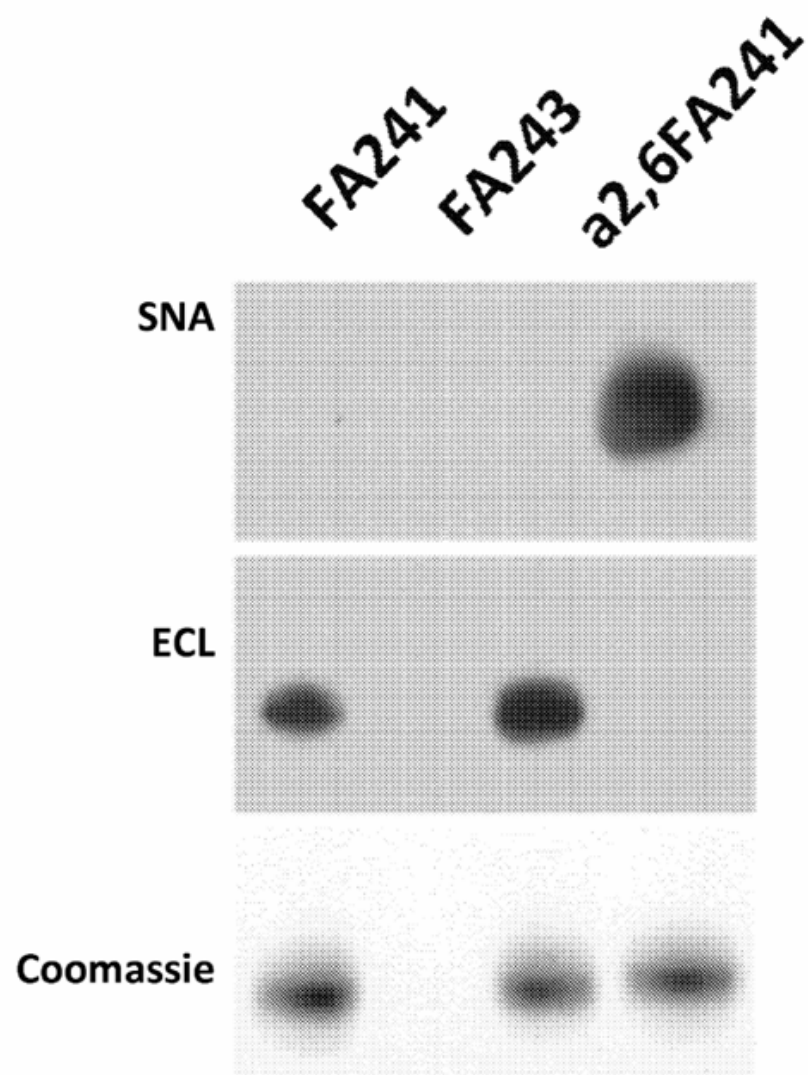


FIGURA 2 B

FIGURA 3

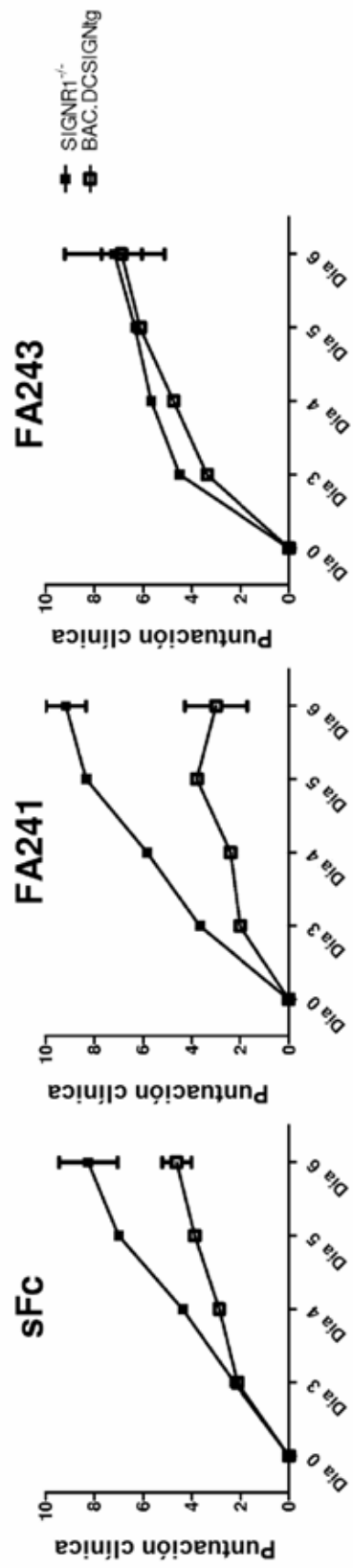
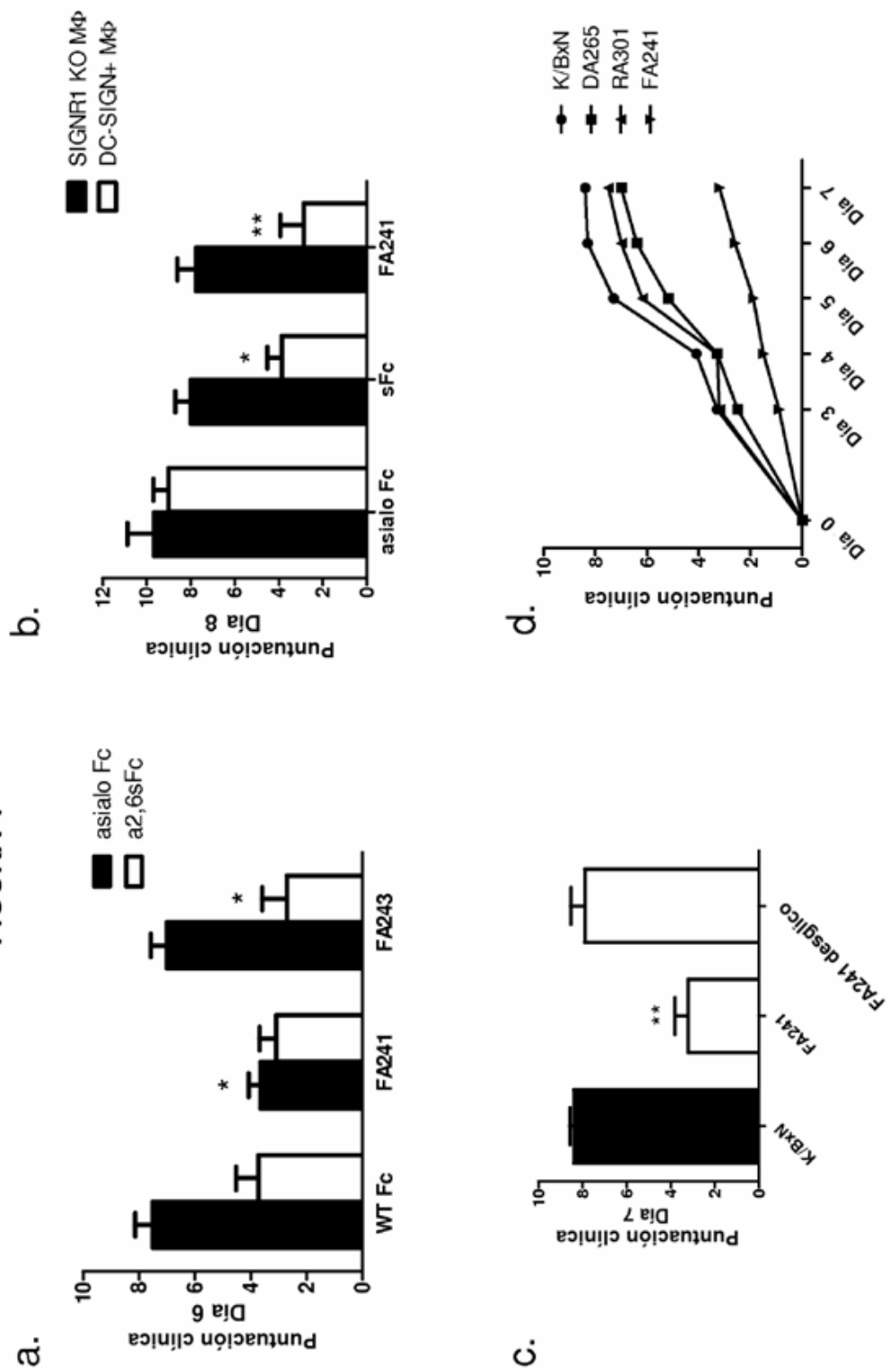


FIGURA 4



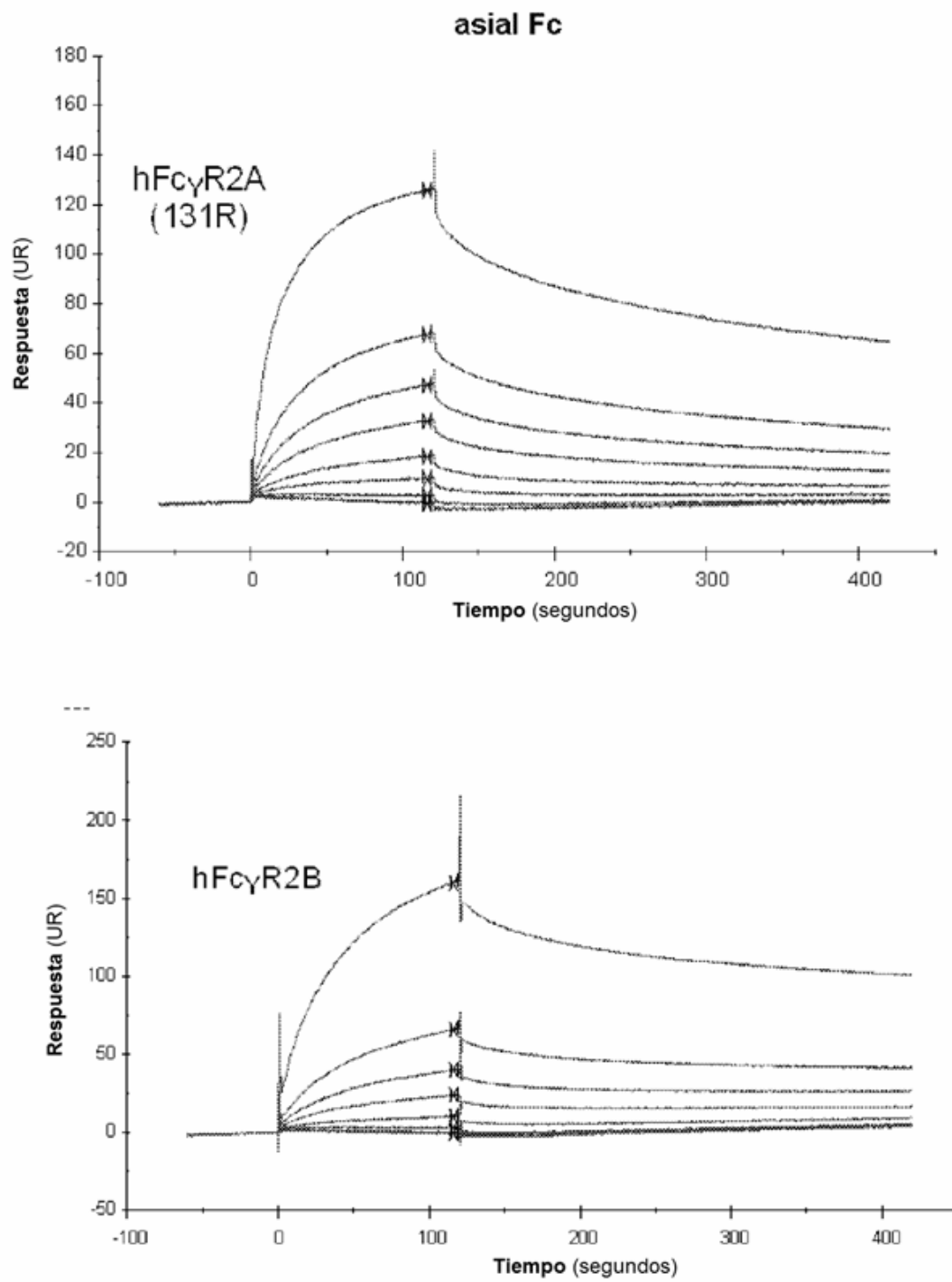
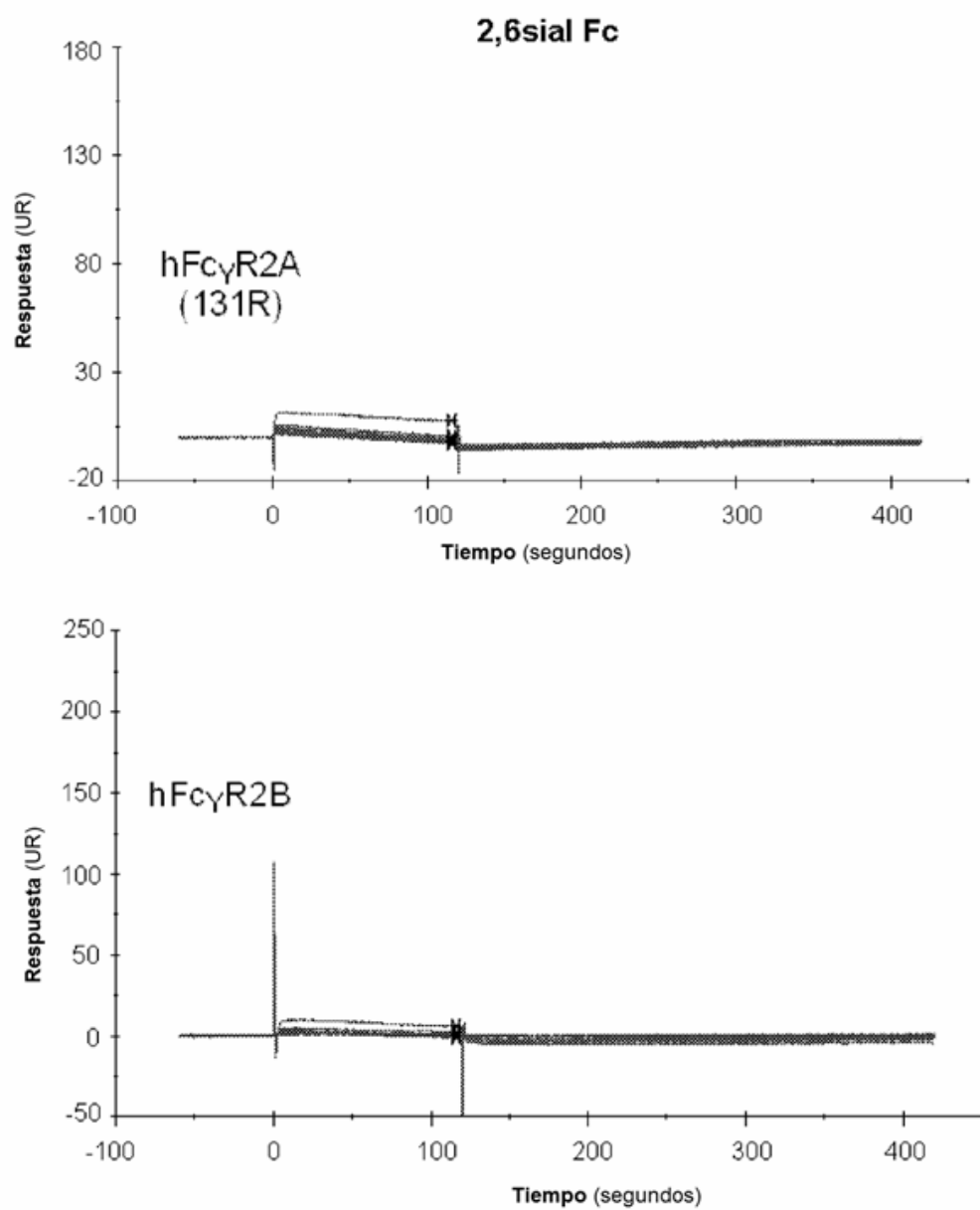


FIGURA 5



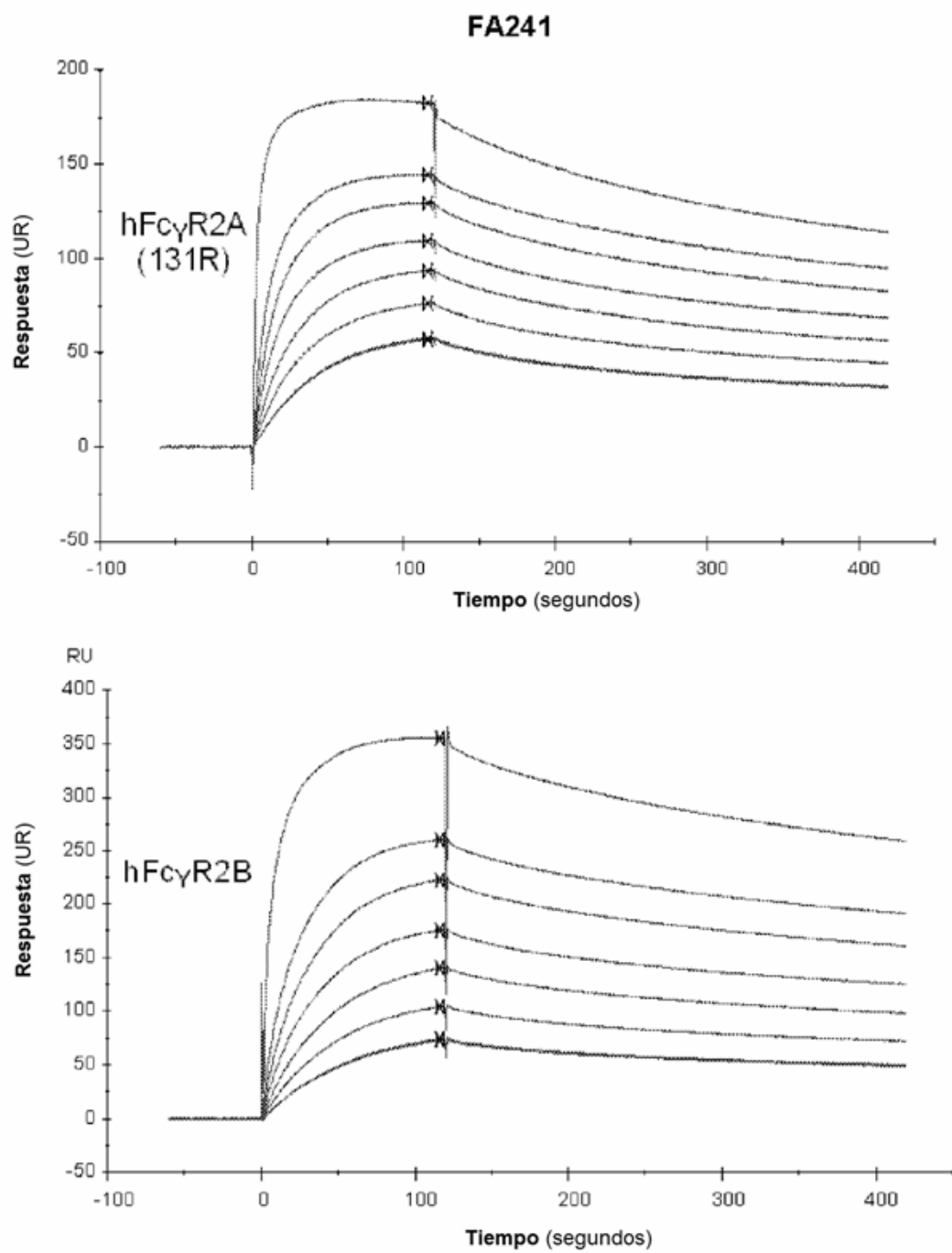


FIGURA 5 Continuación

FIGURA 6

