

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 545**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2018 PCT/JP2018/037505**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2019 WO19097898**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2018 E 18877418 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024 EP 3712265**

54 Título: **AIM variante**

30 Prioridad:

16.11.2017 JP 2017220733

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

27.06.2024

73 Titular/es:

MIYAZAKI, TORU (100.0%)
c/o The Institute for AIM Medicine, TWIns, 8-1,
Kawada-cho, Shinjuku-ku
Tokyo 162-8666, JP

72 Inventor/es:

ARAI, SATOKO y
MIYAZAKI, TORU

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 974 545 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

AIM variante

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a un AIM mutante, un ácido nucleico que codifica el AIM mutante, un vector de expresión que contiene el ácido nucleico, una célula hospedadora que contiene el vector de expresión, un método de producción de un AIM mutante usando la célula hospedadora y una composición farmacéutica que contiene el AIM mutante.

[Antecedentes de la técnica]

10 El AIM (inhibidor de la apoptosis de macrófagos, o CD5L) es un factor que es producido específicamente por un macrófago identificado por los presentes inventores y suprime la apoptosis del propio macrófago (documento no de patente 1), y hasta ahora se ha sugerido una asociación con varias enfermedades. Por ejemplo, la concentración sanguínea de AIM aumenta con la obesidad, y los adipocitos absorben AIM debido a la endocitosis mediada por CD36 e induce la lipólisis de las grasas neutras acumuladas, lo que sugiere una relación con la antiobesidad (documento no de patente 2). El AIM libera ácidos grasos libres de los adipocitos mediante lipólisis de grasas neutras, y el ácido graso liberado induce/mantiene la inflamación crónica en el tejido adiposo mediante la estimulación de receptores de tipo Toll. El síndrome metabólico se basa en la adquisición de resistencia a la insulina asociada a la obesidad. Puesto que la inflamación crónica en el tejido adiposo es importante, se dice que el AIM está asociado con el síndrome metabólico (documento no de patente 3). Los presentes inventores también aclararon que el AIM suprime la diferenciación de células progenitoras de grasa en adipocitos maduros e induce la descomposición de gotitas de grasa en adipocitos, e informaron sobre la posibilidad de aplicación del AIM a la obesidad (documento de patente 1). Además, los presentes inventores aclararon que los ratones obesos con desactivación génica (KO) de AIM cargados con una dieta alta en calorías muestran una patología semejante a la patología de EHNA humana, tal como obesidad, hígado graso, fibrosis del parénquima hepático y carcinogénesis, e informaron sobre la posibilidad de aplicación del AIM a enfermedades hepáticas (documento de patente 2). Además, los presentes inventores aclararon que los ratones KO de AIM que se sometieron a reperusión de isquemia renal transitoria bilateral desarrollaron insuficiencia renal aguda, seguida de la acumulación de células tubulares renales necróticas y la rápida progresión acompañante de renopatía, exacerbación de la afección sistémica, y se confirmó una alta frecuencia de muerte. Los inventores mostraron que cuando se administró AIM a los ratones KO de AIM, el nivel de BUN mejoró, la función renal mejoró rápidamente y también mejoraron los síntomas sistémicos y la mortalidad, e informaron sobre la posibilidad del tratamiento de la insuficiencia renal aguda y la profilaxis o tratamiento de enfermedades renales crónicas mediante la suplementación con AIM (documento de patente 3). También, los inventores informaron que, en la sangre, el AIM forma un complejo con pentámero de IgM en la región Fc, que protege al AIM de la filtración renal y mantiene un nivel alto de AIM en sangre (documentos no de patente 4, 5).

35 Generalmente, cuando se usa como producto farmacéutico una proteína que tiene un efecto farmacológico, es necesario preparar una proteína uniforme que satisfaga condiciones tales como mantenimiento de la función, ausencia de coagulación y similares. Un método típico para preparar una proteína es un método que incluye cultivar una célula en donde se ha introducido un vector de expresión que tiene un ácido nucleico que codifica una proteína deseada, y aislar y purificar una proteína recombinante secretada dentro de la célula o secretada en el medio de cultivo a partir de la célula. En el presente método, se usa preferiblemente *Escherichia coli* como célula hospedadora porque es fácil de manejar en transferencia de genes, cultivo y similares. Sin embargo, pueden ocurrir problemas durante la preparación de proteínas en condiciones diferentes al entorno original. Por ejemplo, las proteínas derivadas de eucariotas pueden formar enlaces disulfuro intramoleculares entre cisteínas cuando forman estructuras de orden superior. Cuando se prepara tal proteína transformando *Escherichia coli*, se previene la formación de enlaces disulfuro ya que el citoplasma de *Escherichia coli* está bajo fuertes condiciones reductoras. Como resultado, pueden ocurrir problemas en el sentido de que la estructura original de orden superior no se reproduce, la proteína recombinante purificada pierde su función original o exhibe toxicidad, y similares. Cuando se usa una célula de mamífero como célula hospedadora y la proteína diana se expresa en una concentración superior a aquella a la que la proteína está normalmente presente en la célula, las proteínas recombinantes pueden formar un multímero mediante un enlace disulfuro, lo que puede afectar la purificación de la proteína recombinante o la farmacocinética in vivo. Puesto que el AIM contiene 3 dominios de receptor depurador rico en cisteína (SRCR) que constan de aproximadamente 100 aminoácidos que contienen muchas cisteínas, *Escherichia coli* no es adecuada como célula hospedadora cuando se produce AIM recombinante, e incluso cuando se usan células de mamíferos, era necesario verificar si el AIM recombinante está multimerizado o no, y cuando se confirma la multimerización, se debe considerar un medio para prevenir la multimerización. Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún informe sobre la multimerización del AIM recombinante. Además, puesto que el AIM que formaba un complejo con pentámero de IgM se vuelve inactivo, cuando se administra AIM recombinante como producto farmacéutico, es necesario controlar la formación de un complejo de AIM y pentámero de IgM. Este problema sigue sin resolverse.

[Lista de documentos]

[Documentos de patente]

Documento de patente 1: WO 2010/140531

Documento de patente 2: WO 2013/162021

5 Documento de patente 3: WO 2015/119253

[documentos no de patente]

Documento no de patente 1: T. Miyazaki et al., J Exp Med. 189:413-422, 1999

Documento no de patente 2: J. Kurokawa et al., Cell Metab. 11:479-492, 2010

Documento no de patente 3: J. Kurokawa, Proc Natl Acad Sci U S A., 108:12072-12077, 2011

10 Documento no de patente 4: S. Arai et al., Cell Rep. 3:1187-1198, 2013

Documento no de patente 5: T. Miyazaki et al., Cell Mol Immunol. 15:562-574, 2018

[Sumario de la invención]

[Problema técnico]

15 La presente invención tiene como objetivo proporcionar un AIM recombinante que mantenga funciones, no multimerice y no sea inactivado por IgM.

[Solución al problema]

Los presentes inventores confirmaron que se forma un multímero cuando se expresa un AIM humano recombinante de tipo silvestre usando HEK293, y se centraron en la cisteína contenida en el AIM humano como causa de la multimerización. Los presentes inventores predijeron a partir de la predicción de la estructura tridimensional de AIM humano que la cisteína en el aminoácido número 168 y la cisteína en el aminoácido número 277 de AIM humano de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 1 están implicadas en la formación de multímeros. Se confirmó que el AIM recombinante humano mutante no se multimeriza cuando se prepara un AIM recombinante humano mutante en donde la cisteína está sustituida por serina. La eficacia de recuperación del AIM recombinante mutante aumentó en comparación con la del AIM recombinante de tipo silvestre. Además, el AIM humano recombinante mutante mantuvo la actividad endocitótica en los macrófagos, que es una de las funciones del AIM humano de tipo silvestre. Sorprendentemente, se confirmó que la actividad mejoró significativamente en AIM en donde la cisteína del aminoácido número 168 de AIM humano de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 1 se reemplazó por serina. También se confirmó que el AIM recombinante de ratón de tipo silvestre forma un dímero, y también se encontró que la cisteína en el aminoácido número 168 del AIM de ratón de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 2 es la causa de la formación de dímero. Además, el AIM humano mutante y el AIM de ratón mutante en donde la cisteína en el aminoácido número 168 del AIM humano de tipo silvestre y la cisteína en el aminoácido número 168 del AIM de ratón de tipo silvestre están respectivamente sustituidas por serina no forman un complejo con el pentámero de IgM. Los presentes inventores realizaron estudios adicionales basados en estos hallazgos y completaron la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona

35 [1] un AIM humano mutante que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes (1) a (4) y que tiene una actividad de AIM humano de tipo silvestre

(1) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido,

40 (2) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por otro aminoácido,

(3) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido, y la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por otro aminoácido,

45 (4) una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de (1) a (3), que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1) a (3) y el otro aminoácido sustituido,

- en donde actividad del AIM humano de tipo silvestre significa al menos una de las actividades seleccionadas del grupo que consiste en: actividad de endocitosis en macrófagos, actividad supresora de apoptosis de macrófagos, actividad de mantenimiento/promoción de arteriosclerosis, actividad supresora de la diferenciación de adipocitos, actividad lipolítica de adipocitos, actividad reductora de adipocitos, actividad de unión a CD36, actividad de endocitosis de adipocitos, actividad de unión a FAS, actividad supresora de la función FAS, actividad antiobesidad, actividad preventiva o terapéutica de enfermedades hepáticas (hígado graso, EHNA, cirrosis hepática o cáncer de hígado) y actividad preventiva o terapéutica de enfermedades renales (insuficiencia renal aguda, nefritis crónica, insuficiencia renal crónica, síndrome nefrótico, nefropatía diabética, nefrosclerosis, nefropatía por IgA, nefropatía hipertensiva, nefropatía asociada a enfermedad del colágeno o nefropatía por IgM);
- 5 [2] el AIM humano mutante de [1], en donde el otro aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, glutamina, serina y treonina;
- [3] el AIM humano mutante de [1], en donde el otro aminoácido es serina;
- [4] un AIM de ratón mutante que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes (1) a (3) y que tiene una actividad de AIM de ratón de tipo silvestre
- 15 (1) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido,
- (2) una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de al menos el 98 % con la secuencia de aminoácidos de (1), donde permanecen las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1) y el otro aminoácido sustituido,
- 20 (3) una secuencia de aminoácidos según (1) que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1) y el otro aminoácido sustituido
- en donde actividad del AIM de ratón de tipo silvestre significa al menos una de las actividades seleccionadas del grupo que consiste en: actividad de endocitosis en macrófagos, actividad supresora de apoptosis de macrófagos, actividad de mantenimiento/promoción de arteriosclerosis, actividad supresora de la diferenciación de adipocitos, actividad lipolítica de adipocitos, actividad reductora de adipocitos, actividad de unión a CD36, actividad de endocitosis de adipocitos, actividad de unión a FAS, actividad supresora de la función FAS, actividad antiobesidad, actividad preventiva o terapéutica de enfermedades hepáticas (hígado graso, EHNA, cirrosis hepática o cáncer de hígado) y actividad preventiva o terapéutica de enfermedades renales (insuficiencia renal aguda, nefritis crónica, insuficiencia renal crónica, síndrome nefrótico, nefropatía diabética, nefrosclerosis, nefropatía por IgA, nefropatía hipertensiva, nefropatía asociada a enfermedad del colágeno o nefropatía por IgM);
- 25 [5] el AIM de ratón mutante de [4], en donde el otro aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, glutamina, serina y treonina;
- [6] el AIM de ratón mutante de [4], en donde el otro aminoácido es serina;
- 35 [7] un ácido nucleico que comprende la secuencia de bases de las siguientes (1) o (2)
- (1) una secuencia de bases que codifica el AIM humano mutante de una cualquiera de [1] a [3],
- (2) una secuencia de bases que codifica el AIM de ratón mutante de una cualquiera de [4] a [6];
- [8] un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de [7];
- [9] una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de [8];
- 40 [10] un método para producir un AIM humano mutante o un AIM de ratón mutante, que comprende cultivar la célula hospedadora de [9];
- [11] una composición farmacéutica que comprende un AIM mutante de los siguientes (1) o (2)
- (1) el AIM humano mutante de una cualquiera de [1] a [3],
- (2) el AIM de ratón mutante de una cualquiera de [4] a [6];
- 45 y similares.

[Efectos ventajosos de la invención]

El AIM mutante de la presente invención tiene una función equivalente a la del AIM recombinante de tipo silvestre, o tiene una función mejorada, y se caracteriza porque no se multimeriza cuando se expresa como un AIM recombinante. Debido a la ausencia de multimerización, el AIM recombinante no precipita por insolubilización y, como resultado, se

mejora la tasa de recuperación del AIM recombinante y se evita el riesgo asociado con la administración in vivo. Además, el AIM mutante de la presente invención tiene la característica de que, cuando se administra a un cuerpo vivo, no forma un complejo con un pentámero de IgM y, como resultado, no se inactiva. Por lo tanto, se puede prevenir una disminución en el título del AIM mutante administrado y se puede reducir la dosis.

5 **[Breve descripción de los dibujos]**

La Fig. 1 muestra una imagen electroforética de rAIM humano de tipo silvestre después de la purificación y concentración. Monómero: monómero, Dímero: dímero, Polímero: multímero. La parte de color oscuro en la parte superior del gel (indicada por una flecha) es un multímero que tiene un peso molecular enorme.

10 La Fig. 2 muestra una imagen electroforética de rAIM de ratón de tipo silvestre después de la purificación y concentración. Monómero: monómero, Dímero: dímero.

La Fig. 3 muestra las secuencias de aminoácidos de los AIM humanos de tipo silvestre 2CS, 3CS y 2/3CS. La parte subrayada indica la bisagra que conecta los dominios de SRCR.

La Fig. 4 muestra una estructura tridimensional de AIM humano de tipo silvestre.

La Fig. 5 muestra una estructura tridimensional de AIM de ratón de tipo silvestre.

15 La Fig. 6 muestra las secuencias de aminoácidos de AIM de ratón 2CS y de tipo silvestre. La parte subrayada indica la bisagra que conecta los dominios de SRCR.

La Fig. 7 muestra imágenes electroforéticas de rAIM humanos de tipo silvestre, 2CS, 3CS y 2/3CS después de la purificación y concentración. Monómero: monómero, Dímero: dímero, Polímero: multímero. Las otras bandas son contaminación con proteínas no específicas distintas a AIM.

20 La Fig. 8 muestra una imagen electroforética de rAIM de ratón 2CS y de tipo silvestre después de la purificación y concentración. Monómero: monómero, Dímero: dímero.

La Fig. 9 es un dibujo que muestra la captación de rAIM por células de macrófagos peritoneales. El eje vertical muestra la intensidad de la fluorescencia.

25 La Fig. 10 muestra una imagen de transferencia Western (A) de proteínas obtenidas a partir de sobrenadante de cultivo que contiene rAIM de ratón de tipo silvestre o 2CS y pentámero de IgM de ratón, y una imagen de transferencia Western (B) de proteínas obtenidas de sobrenadante de cultivo que contiene rAIM humano de tipo silvestre o 2CS y pentámero de IgM. a-mAIM: anti-AIM de ratón, a-hAIM: anti-AIM humano, a-mIgM: anti-IgM de ratón, a-hIgM: anti-IgM humano.

[Descripción de realizaciones]

30 La presente invención proporciona un AIM humano mutante como se define en las reivindicaciones 1-3 que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes (1a) a (4a) y que tiene una actividad de AIM humano de tipo silvestre (en lo sucesivo también se denominará como el AIM humano mutante de la presente invención)

35 (1a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido,

(2a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por otro aminoácido,

40 (3a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido, y una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por otro aminoácido,

(4a) una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de (1a) a (3a), que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1a) a (3a) y el otro aminoácido sustituido.

45 Además, el AIM humano mutante de la presente invención contiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes (1b) a (4b).

(1b) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por serina (SEQ ID NO: 3),

(2b) una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por serina (SEQ ID NO: 4),

(3b) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por serina, y una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por serina (SEQ ID NO: 5),

5 (4b) una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de (1b) a (3b), que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1b) a (3b) y la serina sustituida.

En la presente invención, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de AIM humano de tipo silvestre. El AIM humano de tipo silvestre es una proteína presente principalmente en la sangre que contiene tres dominios ricos en cisteína de receptor depurador rico en cisteína (SRCR). El dominio SRCR1, el dominio SRCR2 y el dominio SRCR3 contenidos en el AIM humano de tipo silvestre contienen 8, 9 y 9 cisteínas, respectivamente. De estas cisteínas, 8, 8 y 8 cisteínas contribuyen respectivamente a la formación de enlaces disulfuro intramoleculares y el AIM humano de tipo silvestre forma una estructura de orden superior. Las cisteínas que no están implicadas en la formación de una estructura de orden superior de AIM humano de tipo silvestre in vivo son la cisteína en el aminoácido número 168 y la cisteína en el aminoácido número 277 en la SEQ ID NO: 1. Estas dos cisteínas presentes en Los AIM humanos de tipo silvestre no contribuyen al enlace disulfuro intramolecular, sino que forman un enlace disulfuro intermolecular entre los AIM humanos recombinantes. Como resultado, el AIM humano recombinante se multimeriza y precipita como una proteína insolubilizada. Además, la cisteína mencionada anteriormente en el aminoácido número 168 de la SEQ ID NO: 1 forma un complejo que consiste en AIM humano de tipo silvestre y pentámero de IgM humana formando un enlace disulfuro intermolecular con una cisteína particular en el pentámero de IgM e inactiva el AIM humano de tipo silvestre.

Como se mencionó anteriormente, el AIM humano mutante de la presente invención contiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes (1a) a (3a).

(1a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido.

25 (2a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por otro aminoácido.

(3a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido, y una secuencia de aminoácidos como se muestra en por SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituido por otro aminoácido.

30 El AIM humano mutante recombinante de la presente invención previene la formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre AIM humanos recombinantes mediante la sustitución de cisteína en el aminoácido número 168 y/o la cisteína en el aminoácido número 277 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 por diferentes aminoácidos, mediante lo cual se puede prevenir la multimerización de AIM humano recombinante. Además, previene la formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre AIM humano recombinante y pentámero de IgM al sustituir la cisteína en el aminoácido número 168 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido diferente, por lo que la inactivación de AIM humano recombinante puede ser prevenida. Los diferentes aminoácidos usados para la sustitución de la cisteína mencionada anteriormente en el aminoácido número 168 y/o la cisteína en el aminoácido número 277 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 no están particularmente limitados siempre que el AIM humano mutante obtenido pueda mantener o mejorar actividades semejantes a las del AIM humano de tipo silvestre (aquí, "actividad" significa al menos una de las actividades seleccionadas de actividad de endocitosis a macrófagos, actividad supresora de apoptosis de macrófagos, actividad de mantenimiento/promoción de arteriosclerosis, actividad supresora de la diferenciación de adipocitos, actividad lipolítica de adipocitos, actividad reductora de adipocitos, actividad de unión a CD36, actividad de endocitosis de adipocitos, actividad de unión a FAS, actividad supresora de la función FAS, actividad antiobesidad, enfermedades hepáticas (hígado graso, EHNA, cirrosis hepática, cáncer de hígado), actividad preventiva o terapéutica de enfermedades renales (insuficiencia renal aguda, nefritis crónica, insuficiencia renal crónica, síndrome nefrótico, nefropatía diabética, nefroesclerosis, nefropatía por IgA, nefropatía hipertensiva, nefropatía asociada con enfermedad del colágeno o nefropatía por IgM)) y el aminoácido muestre propiedades fisicoquímicas semejantes a las de la cisteína preferiblemente mencionada. Los diferentes aminoácidos para sustituir la cisteína mencionada anteriormente en el aminoácido número 168 y los diferentes aminoácidos para sustituir la cisteína en el aminoácido número 277 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 pueden ser iguales o diferentes. Los ejemplos de aminoácidos semejantes a la cisteína incluyen aminoácidos clasificados como aminoácidos neutros polares, e incluyen específicamente aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en asparagina, glutamina, serina y treonina. Entre estos, se prefiere la serina desde el punto de vista de la semejanza estructural. Por lo tanto, el AIM humano mutante de la presente invención que contiene cualquiera de las secuencias de aminoácidos de (1a) a (3a) mencionadas anteriormente puede ser preferiblemente un AIM humano mutante que contiene una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos.

(1b) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por serina (SEQ ID NO: 3).

(2b) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por serina (SEQ ID NO: 4).

(3b) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por serina, y una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por serina (SEQ ID NO: 5).

En particular, la actividad endocítica de (1b) un AIM humano mutante que contiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3), en donde la cisteína en el aminoácido número 168 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 está sustituida por serina, es mayor que la actividad del AIM humano de tipo silvestre como se muestra en los ejemplos mencionados a continuación y se sugiere que la función como AIM es superior.

El AIM humano mutante de la presente invención puede contener la secuencia de aminoácidos de la siguiente (4a) en lugar de la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las (1a) a (3a) mencionadas anteriormente.

(4a) una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de (1a) a (3a), que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1a) a (3a) y el otro aminoácido sustituido.

El AIM humano mutante de la presente invención puede contener la secuencia de aminoácidos de la siguiente (4b) en lugar de la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las (1b) a (3b) mencionadas anteriormente.

(4b) una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de (1b) a (3b), que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1b) a (3b) y la serina sustituida.

Los ejemplos específicos de la secuencia de aminoácidos sustancialmente igual que la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente de una cualquiera de (1a) a (3a) (o una cualquiera de las (1b) a (3b) mencionadas anteriormente), en donde permanecen las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las (1a) a (3a) mencionadas anteriormente (o las (1b) a (3b) mencionadas anteriormente) y el otro aminoácido sustituido (preferiblemente, el otro aminoácido sustituido es serina) incluyen un aminoácido en donde las cisteínas en los aminoácidos números 10, 26, 39, 44, 73, 83, 91, 101, 124, 140, 153, 158, 168, 185, 195, 205, 215, 230, 246, 259, 264, 277, 292, 302, 312 y 322 de la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1a) a (3a) mencionadas anteriormente (o cualquiera de las (1b) a (3b) mencionadas anteriormente), y los otros aminoácidos sustituidos (preferiblemente, el otro aminoácido sustituido es serina) no se cambian, y las partes de la secuencia de aminoácidos distintas de los aminoácidos tienen una homología de no menos de aproximadamente 85 %, preferiblemente no menos de aproximadamente 90 %, más preferiblemente no menos de aproximadamente 95 %, lo más preferiblemente no menos de aproximadamente 98 %, con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y similares. Como se usa en el presente documento, la "homología" significa la proporción (%) de los mismos residuos de aminoácidos y residuos de aminoácidos semejantes con respecto al total de residuos de aminoácidos superpuestos, en un alineamiento óptimo (preferiblemente, el algoritmo es capaz de considerar la introducción de un hueco en una o ambas secuencias para un alineamiento óptimo), cuando dos secuencias de aminoácidos se alinean usando un algoritmo matemático conocido en el campo técnico. "Aminoácido semejante" significa aminoácidos que tienen propiedades fisicoquímicas semejantes y, por ejemplo, pueden mencionarse aminoácidos clasificados en el mismo grupo tales como aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, Tyr), aminoácidos alifáticos (Ala, Leu, Ile, Val), aminoácidos polares (Gln, Asn), aminoácidos básicos (Lys, Arg, His), aminoácidos ácidos (Glu, Asp), aminoácidos con un grupo hidroxilo (Ser, Thr), aminoácidos con una cadena lateral pequeña (Gly, Ala, Ser, Thr, Met) y similares. Se predice que la sustitución por tales aminoácidos semejantes no cambia el fenotipo de la proteína (es decir, sustitución conservadora de aminoácidos). Los ejemplos específicos de sustitución conservadora de aminoácidos son bien conocidos en el campo técnico y se describen en diversos documentos (p. ej., Bowie et al., Science, 247: 1306-1310 (1990)).

La homología de las secuencias de aminoácidos en la presente memoria descriptiva se puede calcular usando el algoritmo de cálculo de homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) y bajo las siguientes condiciones (expectativa= 10; hueco permitido; matriz= BLOSUM62; filtrado= OFF). Los ejemplos de otro algoritmo para determinar la homología de la secuencia de aminoácidos incluyen el algoritmo descrito en Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877 (1993) [dicho algoritmo está incorporado en el programa NBLAST y XBLAST (versión 2.0) (Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997))], el algoritmo descrito en Needleman y col., J. Mol. Biol., 48: 444-453 (1970) [dicho algoritmo está incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG], el algoritmo descrito en Myers y Miller, CABIOS, 4: 11-17 (1988) [dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de software de alineamiento de secuencias CGC], el algoritmo descrito en Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85: 2444-2448 (1988) [dicho algoritmo está incorporado en el programa FASTA en el paquete de software GCG] y similares, y estos también se pueden usar preferiblemente de manera semejante.

Más preferiblemente, los ejemplos de secuencia de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente de una cualquiera de (1a) a (3a) (o una cualquiera de (1b) a (3b) mencionadas anteriormente), en que permanecen las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1a)

- 5 a (3a) mencionadas anteriormente (o (1b) a (3b) mencionadas anteriormente) y el otro aminoácido sustituido (preferiblemente, el otro aminoácido sustituido es serina) incluyen aminoácidos cuyas cisteínas en los aminoácidos números 10, 26, 39, 44, 73, 83, 91, 101, 124, 140, 153, 158, 168, 185, 195, 205, 215, 230, 246, 259, 264, 277, 292, 302, 312 y 322 de la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1a) a (3a) mencionadas anteriormente (o una cualquiera de (1b) a (3b)), y los otros aminoácidos sustituidos (preferiblemente, el otro aminoácido sustituido es serina) no cambian, y las partes de la secuencia de aminoácidos distintas de los aminoácidos tienen una identidad de no menos de aproximadamente 85 %, preferiblemente no menos de aproximadamente 90 %, más preferiblemente no menos de aproximadamente 95 %, lo más preferiblemente no menos de aproximadamente 98 % con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
- 10 La posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1a) a (3a) mencionadas anteriormente (o (1b) a (3b) mencionadas anteriormente) y el otro aminoácido sustituido (preferiblemente, el otro aminoácido sustituido es serina) es la posición distinta de los aminoácidos números 10, 26, 39, 44, 73, 83, 91, 101, 124, 140, 153, 158, 168, 185, 195, 205, 215, 230, 246, 259, 264, 277, 292, 302, 312 y 322 de la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1a) a (3a) mencionadas anteriormente (o una cualquiera de (1b) a (3b) mencionadas anteriormente), y no está particularmente limitada siempre que sea una posición en donde un AIM humano mutante que contiene delección, adición, inserción o sustitución, o una combinación de las mismas, pueda mantener o mejorar las actividades que tiene el AIM humano de tipo silvestre. El número de delecciones, adiciones, inserciones o sustituciones, o una combinación de las mismas, es de uno a 5, preferiblemente de 1 a 4, de 1 a 3, o de 1 a 2. Los aminoácidos que se van a usar para la sustitución pueden ser semejantes a los aminoácidos mencionados anteriormente.
- 15 La presente invención también proporciona un AIM de ratón mutante como se define en las reivindicaciones 4-6 que contiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes (1c) a (3c) y que tiene una actividad de AIM de ratón de tipo silvestre (en lo sucesivo también denominado AIM de ratón mutante de la presente invención)
- 20 (1c) una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido,
- (2c) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 98 % con la secuencia de aminoácidos de (1c), y permanecen las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1c) y el otro aminoácido sustituido,
- (3c) una secuencia de aminoácidos según (1), que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1c) y el aminoácido sustituido.
- 25 Además, el AIM de ratón mutante de la presente invención contiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes (1d) a (3d).
- (1d) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por serina (SEQ ID NO: 6),
- 30 (2d) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 98 % con la secuencia de aminoácidos de (1d), y permanecen las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1d) y la serina sustituida,
- (3d) una secuencia de aminoácidos según (1) que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1d) y la serina sustituida.
- 35 En la presente invención, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de AIM de ratón de tipo silvestre. De manera semejante al AIM humano de tipo silvestre, el AIM de ratón de tipo silvestre contiene 3 dominios de SRCR. Las cisteínas contenidas en el dominio SRCR1, el dominio SRCR2 y el dominio SRCR3 son, a diferencia del AIM humano de tipo silvestre, 8, 9 y 8, respectivamente. La cisteína que no está implicada en la formación de la estructura de orden superior del AIM de ratón de tipo silvestre in vivo es solo la cisteína en el aminoácido número 168 en la SEQ ID NO: 2. Esta cisteína presente en el AIM de ratón de tipo silvestre no contribuye al enlace disulfuro intramolecular, sino que forma un enlace disulfuro intermolecular entre AIM de ratón recombinantes. Como resultado, el AIM de ratón recombinante se dimeriza. Además, la cisteína mencionada anteriormente en el aminoácido número 168 de la SEQ ID NO: 2 forma un complejo que consiste en AIM de ratón de tipo silvestre y pentámero de IgM de ratón, formando un enlace disulfuro intermolecular con una cisteína particular en el pentámero de IgM, e inactiva el AIM de ratón de tipo silvestre.
- 40 Como se mencionó anteriormente, el AIM de ratón mutante de la presente invención contiene (1c) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido.
- 45 El AIM de ratón mutante de la presente invención previene la formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre AIM de ratón recombinantes al sustituir la cisteína en el aminoácido número 168 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 por un aminoácido diferente, con lo que puede prevenirse la dimerización del AIM de
- 50
- 55

ratón recombinante. Además, previene la formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre AIM de ratón recombinante y pentámero de IgM al sustituir la cisteína en el aminoácido número 168 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 por un aminoácido diferente, con lo que puede prevenirse la inactivación de AIM de ratón recombinante. Los diferentes aminoácidos usados para la sustitución de la cisteína mencionada anteriormente en el aminoácido número 168 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 no están particularmente limitados siempre que el AIM de ratón mutante obtenido pueda mantener o mejorar actividades semejantes a las del AIM de ratón de tipo silvestre (aquí, "actividad" significa lo mismo que en el AIM humano de tipo silvestre). Se prefiere un aminoácido que muestre propiedades fisicoquímicas semejantes a las de la cisteína. Los ejemplos de aminoácidos semejantes a la cisteína incluyen aminoácidos clasificados como aminoácidos neutros polares, e incluyen específicamente aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en asparagina, glutamina, serina y treonina. Entre estos, se prefiere la serina desde el punto de vista de la semejanza estructural. Por lo tanto, el AIM de ratón mutante mencionado anteriormente de la presente invención es preferiblemente AIM de ratón mutante que contiene (1d) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por serina (SEQ ID NO: 6).

El AIM de ratón mutante de la presente invención puede contener la secuencia de aminoácidos de las siguientes (2c) o (3c) en lugar de la secuencia de aminoácidos de (1c) mencionada anteriormente.

(2c) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 98 % con la secuencia de aminoácidos de (1c), y permanecen las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1c) y el otro aminoácido sustituido,

(3c) una secuencia de aminoácidos según (1c), que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1c) y el aminoácido sustituido.

El AIM de ratón mutante de la presente invención también puede contener la secuencia de aminoácidos de las siguientes (2d) o (3d) en lugar de la secuencia de aminoácidos de (1d) mencionada anteriormente.

(2d) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 98 % con la secuencia de aminoácidos de (1d), y permanecen las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1d) y la serina sustituida,

(3d) una secuencia de aminoácidos según (1d) que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1d) y la serina sustituida.

Los ejemplos específicos de la secuencia de aminoácidos sustancialmente igual que la secuencia de aminoácidos de (1c) mencionada anteriormente (o de (1d) mencionada anteriormente), en que permanecen las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1c) mencionada anteriormente (o de (1d) mencionada anteriormente) y el otro aminoácido sustituido (preferiblemente, el otro aminoácido sustituido es serina) incluyen un aminoácido en que las cisteínas en los aminoácidos números 10, 26, 39, 44, 72, 82, 91, 101, 124, 140, 153, 158, 168, 185, 195, 204, 214, 229, 245, 258, 263, 291, 301, 311 y 321 de la secuencia de aminoácidos de (1c) mencionada anteriormente (o de (1d) mencionada anteriormente), y los otros aminoácidos sustituidos (preferiblemente, el otro aminoácido sustituido es serina) no cambian, y las partes de la secuencia de aminoácidos distintas de los aminoácidos tienen una homología de no menos de aproximadamente 85 %, preferiblemente no menos de aproximadamente 90 %, más preferiblemente no menos de aproximadamente 95 %, lo más preferiblemente no menos de aproximadamente 98 %, con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y similares. Como se usa en el presente documento, la "homología" significa lo mismo que anteriormente.

Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual que la secuencia de aminoácidos de (1c) mencionada anteriormente (o de (1d) mencionada anteriormente), en que permanecen las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1c) mencionada anteriormente (o de (1d) mencionada anteriormente) y el otro aminoácido sustituido (preferiblemente, el otro aminoácido sustituido es serina) es un aminoácido en que las cisteínas en los aminoácidos números 10, 26, 39, 44, 72, 82, 91, 101, 124, 140, 153, 158, 168, 185, 195, 204, 214, 229, 245, 258, 263, 291, 301, 311 y 321 de la secuencia de aminoácidos de (1c) mencionada anteriormente (o de (1d) mencionada anteriormente), y los otros aminoácidos sustituidos (preferiblemente, el otro aminoácido sustituido es serina) no cambian, y las partes de la secuencia de aminoácidos distintas de los aminoácidos tienen una identidad de no menos de aproximadamente 85 %, preferiblemente no menos de aproximadamente 90 %, más preferiblemente no menos de aproximadamente 95 %, lo más preferiblemente no menos de aproximadamente 98 %, con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y similares.

La posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1c) mencionada anteriormente (o de (1d) mencionada anteriormente) y el otro aminoácido sustituido (preferiblemente, el otro aminoácido sustituido es serina) es la posición distinta que los aminoácidos números 10, 26, 39, 44, 72, 82, 91, 101, 124, 140, 153, 158, 168, 185, 195, 204, 214, 229, 245, 258, 263, 291, 301, 311 y 321 de la secuencia de aminoácidos de (1c) mencionada anteriormente (o de (1d) mencionada anteriormente), y no está particularmente limitada siempre que sea una posición en que un AIM de ratón mutante que contiene delección, adición, inserción o sustitución, o una combinación de las mismas, pueda mantener o mejorar las actividades que tiene el AIM de ratón de tipo silvestre. Las actividades del AIM

de ratón de tipo silvestre, los aminoácidos usados para la sustitución, el número de aminoácidos para la delección, adición, inserción o sustitución o una combinación de los mismos, y similares, pueden ser semejantes a los del AIM humano mutante de la presente invención.

5 Al AIM humano mutante de la presente invención y al AIM de ratón mutante (en lo sucesivo, el AIM humano mutante de la presente invención y el AIM de ratón mutante también se denominan colectivamente AIM mutante de la presente invención) se les puede añadir además un péptido señal. El AIM humano de tipo silvestre se traduce en la célula como un AIM humano de tipo silvestre inmaduro en que un péptido señal mostrado en la SEQ ID NO: 7 está ligado al extremo N de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y se convierte en una proteína madura mediante la escisión del péptido señal anteriormente mencionado cuando se secreta fuera de la célula. De manera semejante, el
10 AIM de ratón de tipo silvestre se traduce en la célula como un AIM de ratón de tipo silvestre inmaduro en que un péptido señal mostrado en la SEQ ID NO: 8 está enlazado al extremo N de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, y se convierte en una proteína madura mediante la escisión del péptido señal anteriormente mencionado cuando se secreta fuera de la célula. Debido a la adición del péptido señal, cuando el AIM mutante se expresa en las células como un AIM recombinante, el AIM mutante se secreta fuera de la célula y se facilita la
15 recuperación.

El AIM mutante de la presente invención se puede producir según un método de síntesis de péptidos conocido.

El método de síntesis de péptidos puede ser cualquiera de, por ejemplo, proceso de síntesis en fase sólida y proceso de síntesis en fase de solución. El AIM mutante objeto se puede producir condensando un péptido o aminoácido parcial capaz de constituir el AIM mutante de la presente invención y la porción restante y, cuando el producto resultante tiene
20 un grupo protector, retirando el grupo protector.

Aquí, la condensación y retirada del grupo protector se efectúan según un método conocido per se, por ejemplo, los métodos descritos en los siguientes (1) y (2).

(1) M. Bodanszky y M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, Nueva York (1966)

(2) Schroeder y Luebke, The Peptide, Academic Press, Nueva York (1965)

25 El AIM mutante así obtenido de la presente invención se puede purificar y aislar mediante un método de purificación conocido. Los ejemplos del método de purificación aquí incluyen extracción con disolventes, destilación, cromatografía en columna, cromatografía líquida, recristalización, una combinación de estos y similares.

30 Cuando el AIM mutante de la presente invención obtenido mediante el método mencionado anteriormente es una forma libre, la forma libre se puede convertir en una sal adecuada mediante un método conocido o un método análogo al mismo. A la inversa, cuando el AIM mutante de la presente invención se obtiene como una sal, la sal se puede convertir a una forma libre u otra sal mediante un método conocido o un método análogo al mismo.

35 Además, el AIM mutante de la presente invención también se puede producir cultivando una célula hospedadora que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que lo codifica, y separando y purificando el AIM mutante del cultivo resultante. El ácido nucleico que codifica el AIM mutante de la presente invención puede ser ADN o ARN, o puede ser una quimera de ADN/ARN. Se prefiere el ADN. Además, el ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario. Cuando es bicatenario, puede ser un ADN bicatenario, un ARN bicatenario o un híbrido de ADN:ARN. Cuando es monocatenario, puede ser una hebra con sentido (es decir, una hebra codificante) o una hebra antisentido (es decir, una hebra no codificante).

40 Como ADN que codifica el AIM mutante de la presente invención, se pueden mencionar ADN sintético y similares. Por ejemplo, se puede adquirir convirtiendo, según un método conocido per se tal como el método ODA-LA PCR, el método Gapped dúplex, el método Kunkel y similares, o un método análogo a los mismos, y usando un kit conocido, por ejemplo, Mutan™-super Express Km (TAKARA BIO INC.), Mutan™-K (TAKARA BIO INC.) y similares, un cebador para la introducción de mutaciones y un ADNc de AIM de longitud completa (p. ej., en el caso del ser humano, se puede
45 mencionar la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 9, en el caso de ratón, se puede mencionar la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 10), que se amplificó directamente mediante transcriptasa inversa-PCR (en lo sucesivo abreviado como "método de RT-PCR") usando ARN total o una fracción de ARNm preparada a partir de una célula o tejido como molde. Como alternativa, también puede adquirirse convirtiendo, según el método mencionado anteriormente, un ADNc clonado a partir de una genoteca de ADNc, preparado insertando un fragmento del ARN total o ARNm mencionado anteriormente en un vector adecuado, mediante un método de hibridación en colonia o en placa
50 o método de PCR y similares. El vector usado para la genoteca puede ser cualquiera tal como bacteriófago, plásmido, cósmido, fagémido y similares.

El ácido nucleico que contiene una secuencia de bases que codifica el AIM mutante de la presente invención no está limitado siempre que sea un ácido nucleico que contenga un codón correspondiente a la secuencia de aminoácidos del AIM mutante de la presente invención. Los ejemplos del mismo en el caso de un AIM humano mutante al que se
55 ha añadido un péptido señal incluyen un ADN que contiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de bases que la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 11 en que G en la base número 572 de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 9 está sustituida por C, la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 12 en que G

en la base número 899 de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 9 está sustituida por C, o la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 13 que tiene ambas sustituciones y similares; en el caso de AIM de ratón mutante al que se le ha añadido un péptido señal, incluyen un ADN que contiene una secuencia de bases igual o sustancialmente igual que la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 14 en que G en la base número 581 de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 10 está sustituida por C y similares.

Aquí, "sustancialmente la misma secuencia de bases" se refiere a una secuencia de bases que tiene una mutación que no cambia la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases original (mutación silenciosa).

Se puede producir un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el AIM mutante de la presente invención, por ejemplo, aislando un fragmento de ADN que codifica el AIM mutante mencionado anteriormente y ligando el fragmento de ADN en el extremo 5' de un promotor en un vector de expresión adecuado. Por ejemplo, se puede obtener un vector de expresión que contiene un ADN que codifica el AIM humano mutante de la presente invención insertando el ADN que consiste en la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 11 en un vector de expresión pCAGGS, y transformando *Escherichia coli* con el plásmido obtenido.

Como vector de expresión, se usa una célula animal que expresa un plásmido (p. ej., pCAGGS, pSR α , pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo).

El promotor puede ser cualquiera siempre que sea un promotor apropiado para el hospedador usado para la expresión génica.

Por ejemplo, cuando el hospedadora es una célula animal, se usan el promotor de β -actina, el promotor de SR α , el promotor de SV40, el promotor de LTR, el promotor de CMV (citomegalovirus), el promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous), el promotor de LTR de MoMuLV (virus de la leucemia de múrido de Moloney), el promotor de HSV-TK (timidina cinasa del virus del herpes simple), el promotor trc, el promotor trc modificado y similares.

Como vector de expresión, se puede usar uno que contenga, cuando se desee, potenciador, señal de corte y empalme, señal de adición de poli A, marcador de selección, origen de replicación de SV40 (a veces abreviado en lo sucesivo como SV40 ori) y similares, además de los mencionados anteriormente. Los ejemplos de marcador de selección incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo, a veces abreviado como dhfr, resistencia al metotrexato (MTX)), el gen de resistencia a la neomicina (en lo sucesivo, a veces abreviado como neo', resistencia a G418) y similares. En particular, cuando se usan células de hámster chino deficientes en el gen dhfr y se usa el gen dhfr como marcador de selección, el gen objeto también puede seleccionarse en un medio libre de timidina.

El AIM mutante puede producirse introduciendo un vector de expresión que contiene el ácido nucleico mencionado anteriormente que codifica el AIM mutante en una célula hospedadora y cultivando la célula hospedadora obtenida.

Como célula hospedadora, es preferible una célula animal para el AIM mutante de la presente invención.

Como célula animal, se usan por ejemplo células como COS-7, Vero, CHO, CHO (dhfr), CHO-K1, CHO-S, L, AtT-20, GH3, FL, HEK293, NIH3T3, Balb3T3, FM3A, L929, SP2/0, P3U1, B16, P388 y similares.

La transferencia de genes se puede efectuar según un método conocido.

El gen puede introducirse en la célula animal según el método descrito en, por ejemplo, Cell Engineering, número adicional 8, New Cell Engineering Experimental Protocol, 263-267 (1995) (publicado por Shujunsha), Virology, vol. 52, 456 (1973).

Una célula hospedadora transfectada puede cultivarse según un método conocido.

Cuando la célula hospedadora es una célula animal, el medio usado para el cultivo es preferiblemente medio mínimo esencial (MEM), medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio RPMI 1640, medio 199 o similares, conteniendo cada uno aproximadamente 5 - aproximadamente 20 % de suero bovino fetal. El pH del medio es preferiblemente aproximadamente 6 - aproximadamente 8. El transformante se cultiva generalmente a aproximadamente 30 - aproximadamente 40 °C durante aproximadamente 15 - aproximadamente 60 h. Cuando sea necesario, se puede efectuar aireación y agitación.

Como se menciona anteriormente, el AIM mutante de la presente invención se puede producir intracelular o extracelularmente usando la célula hospedadora.

El AIM mutante de la presente invención se puede separar y purificar mediante un método conocido per se a partir del cultivo obtenido cultivando la célula hospedadora transfectada anteriormente mencionada.

Por ejemplo, cuando el AIM mutante de la presente invención se extrae del citoplasma de la célula hospedadora, se puede usar un método que incluye suspender las células hospedadoras recogidas de un cultivo mediante un método conocido en un tampón adecuado, romper las células hospedadoras mediante ultrasonidos, lisozima y/o congelación-descongelación y similares, y obtener un extracto bruto de una proteína soluble mediante centrifugación, filtración y similares según sea apropiado. El tampón puede contener un desnaturalizante de proteínas tal como urea,

hidrocloruro de guanidina y similares, y un tensioactivo tal como TritonX-100™ y similares. Cuando el AIM mutante de la presente invención se secreta fuera de la célula, se usa un método para separar el sobrenadante del cultivo del cultivo mediante centrifugación, filtración y similares.

5 El AIM mutante de la presente invención contenido en la fracción soluble y sobrenadante del cultivo así obtenidos se puede aislar y purificar mediante un método conocido per se. Como tal método, se usa un método que utiliza la solubilidad tal como precipitación salina, precipitación con disolvente y similares; un método que utiliza principalmente la diferencia en el peso molecular tal como diálisis, ultrafiltración, método de filtración en gel y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y similares; un método que utiliza la diferencia en la carga eléctrica tal como cromatografía de intercambio iónico y similares; un método que utiliza la afinidad específica tal como cromatografía de afinidad y similares; un método que utiliza la diferencia en la hidrofobicidad tal como cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa y similares; un método que utiliza la diferencia en el punto isoeléctrico tal como enfoque isoeléctrico y similares; un método que usa un anticuerpo y similares. Estos métodos también se pueden combinar según sea apropiado.

15 La presencia del AIM mutante así obtenido de la presente invención se puede confirmar mediante inmunoensayo enzimático, transferencia Western y similares, usando un anticuerpo contra el AIM mutante.

20 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene el AIM mutante de la presente invención (en lo sucesivo también denominada composición farmacéutica de la presente invención). Las invenciones hasta ahora han informado de que el AIM se puede usar para la profilaxis o el tratamiento de la obesidad, enfermedades hepáticas y enfermedades renales (documentos WO 2010/140531, WO 2013/162021, WO 2015/119253). El AIM mutante de la presente invención también mantiene o mejora actividades semejantes a las del AIM de tipo silvestre, también puede usarse para la profilaxis o el tratamiento de la obesidad, enfermedades hepáticas y enfermedades renales.

25 Los ejemplos del sujeto de administración de la composición farmacéutica de la presente invención incluyen humanos y otros animales de sangre caliente (por ejemplo, ratón, rata, conejo, oveja, cerdo, bovino, gato, perro, mono, ave y similares).

30 Las enfermedades hepáticas que serán la diana de aplicación de la composición farmacéutica de la presente invención incluyen, por ejemplo, hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), cirrosis y cáncer de hígado. Las enfermedades renales que serán la diana de aplicación de la composición farmacéutica de la presente invención incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal aguda, nefritis crónica, insuficiencia renal crónica, síndrome nefrótico, nefropatía diabética, nefroesclerosis, nefropatía por IgA, nefropatía hipertensiva y nefropatía asociada con la enfermedad del colágeno o nefropatía por IgM, se prefiere la insuficiencia renal aguda o la insuficiencia renal crónica. La nefropatía asociada con la enfermedad del colágeno está representada, por ejemplo, por la nefritis lúpica.

35 La composición farmacéutica de la presente invención es de baja toxicidad y puede administrarse como líquido tal cual, o como una forma de dosificación apropiada de composición farmacéutica, a humanos u otros mamíferos de sangre caliente (por ejemplo, ratón, rata, conejo, ovejas, cerdos, bovino, gato, perro, mono, ave y similares) por vía oral o parenteral (por ejemplo, administración intravascular, administración subcutánea y similares).

40 Como ejemplos de composición farmacéutica para administración parenteral, se usan inyecciones, supositorios y similares; las inyecciones pueden incluir formas de dosificación tales como inyecciones intravenosas, inyecciones subcutáneas, inyecciones intracutáneas, inyecciones intramusculares e inyecciones de infusión por goteo. Tal inyección puede prepararse según un método conocido públicamente. Se puede preparar una inyección, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el AIM humano mutante mencionado anteriormente de la presente invención en una solución acuosa u oleosa estéril de uso común para inyecciones. Como ejemplos de soluciones acuosas para inyección, se pueden usar solución salina fisiológica, una solución isotónica que comprende glucosa u otro fármaco auxiliar y similares, que se pueden usar en combinación con un solubilizante apropiado, por ejemplo, alcohol (por ejemplo, etanol), polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), tensioactivos no iónicos [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 moles) de aceite de ricino hidrogenado)] y similares. Como ejemplos de soluciones oleosas, se pueden usar aceite de sésamo, aceite de soja y similares, que se pueden usar en combinación con benzoato de bencilo, alcohol bencilico y similares como solubilizantes. Con la solución inyectable preparada se rellena preferiblemente una ampolla adecuada. Los supositorios usados para administración rectal se pueden preparar mezclando el AIM mutante mencionado anteriormente con una base de supositorio ordinaria.

50 Como composición farmacéutica para administración oral, se pueden mencionar formas de dosificación sólidas o líquidas, específicamente comprimidos (incluidos los comprimidos recubiertos de azúcar y los comprimidos recubiertos con película), píldoras, gránulos, polvos, cápsulas (incluidas las cápsulas blandas), jarabes, emulsiones, suspensiones y similares. Tal composición farmacéutica se produce mediante un método públicamente conocido y puede comprender un vehículo, diluyente o excipiente de uso común en el campo de la fabricación farmacéutica. Como ejemplos de vehículo o excipiente para comprimidos, se pueden usar lactosa, almidón, sacarosa, estearato de magnesio y similares.

Si bien la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención varía dependiendo del sujeto de administración, la enfermedad diana, los síntomas, la vía de administración y similares, por ejemplo, cuando se usa para un adulto, el AIM mutante de la presente invención se administra convenientemente por inyección intravenosa típicamente a aproximadamente 0,01 - 20 mg/kg de peso corporal, preferiblemente aproximadamente 0,1 - 10 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente aproximadamente 0,1 - 5 mg/kg de peso corporal, como una dosis, aproximadamente 1 - 5 veces/día, preferiblemente aproximadamente 1 - 3 veces/día, durante aproximadamente 1 - 21 días, preferiblemente aproximadamente 1 - 14 días. En el caso de otras administraciones parenterales y administraciones orales, se pueden administrar dosis semejantes a las mismas. Cuando los síntomas son especialmente graves, se puede aumentar la dosis en función de los síntomas.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener cualquier otro ingrediente activo que no produzca una interacción no deseada cuando se formula con el AIM mutante de la presente invención.

[Ejemplo]

La presente invención se explica más específicamente a continuación haciendo referencia a Ejemplos y Ejemplos de referencia, que no deben considerarse limitativos.

15 **Ejemplo 1: Formación de multímero de AIM recombinante humano (rAIM) de tipo silvestre**

El rAIM humano de tipo silvestre se preparó de la siguiente manera. Es decir, la cepa de expresión estable de AIM humano obtenida mediante la introducción del vector de expresión de AIM humano pCAGGS en HEK293 se cultivó en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen) que contenía FBS al 5 %, Glutamax y gentamicina durante 3 días, y se recuperó el sobrenadante del cultivo. El sobrenadante del cultivo recuperado se aplicó a una columna de anticuerpos obtenida inmovilizando anticuerpo monoclonal anti-AIM humano de ratón (clon 7, fabricado de forma autóloga) en una columna HP activada por NHS HiTrap (GE Healthcare Life Sciences) para purificar el rAIM humano. El rAIM humano unido a la columna de anticuerpos se eluyó con glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5) y se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 1 M (pH 8,5) para obtener eluido de rAIM humano. El tampón en el eluato se substituyó por solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) usando concentradores de filtro Amicon Ultra (Millipore) para efectuar la concentración. El nivel de proteína del concentrado de rAIM humano se cuantificó usando el ensayo de ácido bicinónico (BCA) (Pierce) y la concentración final se ajustó a 2,0 mg/ml con DPBS. La proteína rAIM humana de tipo silvestre (1 ug) purificada y concentrada como se mencionó anteriormente se separó en condiciones no reductoras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) basándose en la diferencia en los pesos moleculares, se efectuó tinción con azul brillante de Coomassie (CBB) y se detectó rAIM humano de tipo silvestre.

Como resultado, cuando se purificó el rAIM humano a partir de la cepa de expresión estable de AIM humano y se preparó como una solución de alta concentración, el rAIM humano formó un multímero (Fig. 1). En particular, se temía la precipitación de algunos de los multímeros que tienen un peso molecular elevado (complejo en que se multimeriza una gran cantidad de rAIM: rAIM multimérico correspondiente a la banda de alto peso molecular en el carril A de la Fig. 1 y rAIM multimérico que permanece en la ranura). Esto sugiere un riesgo de que, cuando el rAIM humano se purifica y se administra a un cuerpo vivo como fármaco terapéutico, los multímeros precipitados puedan bloquear los vasos sanguíneos finos y provocar un accidente grave. En vista de la posible aplicación clínica del rAIM humano en el futuro, se desea la creación de un AIM humano mutante que no forme al menos un multímero que tenga un peso molecular grande.

40 **Ejemplo 2: Formación de multímero de AIM recombinante de ratón (rAIM) de tipo silvestre**

El rAIM de ratón de tipo silvestre se preparó de la siguiente manera. Es decir, la cepa de expresión estable de AIM de ratón obtenida mediante la introducción del vector de expresión de AIM de ratón pCAGGS en HEK293 se cultivó en DMEM que contenía FBS al 5 %, Glutamax y gentamicina durante 3 días, y se recuperó el sobrenadante del cultivo. El sobrenadante del cultivo recuperado se aplicó a una columna de anticuerpos obtenida inmovilizando el anticuerpo monoclonal de rata anti-AIM de ratón (clon 36, fabricado de forma autóloga) en una columna HP activada por NHS HiTrap para purificar rAIM de ratón. El rAIM de ratón unido a la columna de anticuerpos se eluyó con glicina-HCl 0,1 M (pH 2,3) y se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 1 M (pH 8,5) para obtener eluido de rAIM de ratón. El tampón del eluato se substituyó por DPBS usando concentradores de filtro Amicon Ultra para efectuar la concentración. El nivel de proteína del concentrado de rAIM de ratón se cuantificó mediante el ensayo de BCA y la concentración final se ajustó a 2,0 mg/ml con DPBS. La proteína rAIM de ratón de tipo silvestre (1 ug) purificada y concentrada como se menciona anteriormente se separó en condiciones no reductoras mediante SDS-PAGE basándose en la diferencia en los pesos moleculares, se efectuó tinción con CBB y se detectó rAIM de ratón de tipo silvestre.

Como resultado, el rAIM de ratón no formó un multímero como el rAIM humano, y solo estaban presentes monómeros y dímeros (Fig. 2).

55 **Ejemplo 3: Predicción de la estructura tridimensional de AIM humano y de ratón de tipo silvestre**

El AIM humano de tipo silvestre tiene 8, 9, 9 cisteínas en tres dominios de SRCR (SRCR1, SRCR2, SRCR3), respectivamente (Fig. 3). Un péptido señal está enlazado al extremo N de AIM inmaduro y el AIM inmaduro se convierte

en una proteína madura mediante la escisión del péptido señal cuando se secreta fuera de la célula. Para verificar la posibilidad de que el enlace disulfuro mencionado anteriormente debido a la cisteína presente en el AIM humano esté implicado en la multimerización, los presentes inventores predijeron la estructura tridimensional del AIM humano. La estructura tridimensional del AIM humano se predijo mediante modelización de dos etapas de la estructura parcial mostrada por tres dominios de SRCR y la estructura completa, incluidos los tres dominios de SRCR y la bisagra (subrayada en la Fig. 3). Se usó un servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL>) para la modelización de homología para cada dominio de SRCR. Como resultado de la búsqueda de homología de secuencia individual por Blast y HHBlits en los tres dominios de SRCR de AIM humano, el CD6 humano (5a2e.1.A; PDB ID: 5A2E), que pertenece al Grupo B de la superfamilia de SRCR al que pertenece el AIM humano, mostró de manera semejante una buena homología de secuencia de no menos de 30 % con todos los dominios de SRCR. Por lo tanto, usando CD6 humano como molde, Promod-III6 construyó estructuras tridimensionales de tres dominios de SRCR. A continuación, usando Prime versión 4.2 (Schrodinger, LLC, Nueva York, NY, 2015), se construyó toda la estructura del AIM humano mediante la introducción de una secuencia (bisagra) distinta del dominio de SRCR. La estructura tridimensional de todo el AIM humano se obtuvo usando el cálculo de dinámica molecular (310 K, 20 ns) de Desmond con OPLS_2005 como campo de fuerza, y equilibrando toda la estructura del AIM humano en un modelo de caja periódica lleno de moléculas de agua (SPC). Los cuatro enlaces disulfuro en cada dominio de SRCR del AIM humano se reprodujeron usando el dominio de SRCR de CD6 humano como molde. Los resultados de la predicción de la estructura tridimensional del AIM humano de tipo silvestre se muestran en la Fig. 4. Se encontró que 8 cisteínas de las 8, 9, 9 cisteínas presentes respectivamente en los tres dominios de SRCR del AIM humano de tipo silvestre se usan para los enlaces disulfuro en los respectivos dominios de SRCR. Sin embargo, los inventores han encontrado que el AIM humano de tipo silvestre contiene una cisteína aislada (Cys solitaria) en cada uno de los dominios SRCR2 y SRCR3, concretamente, la cisteína en el aminoácido número 168 y la cisteína en el aminoácido número 277 del AIM humano de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 1.

Además, los inventores predijeron la estructura tridimensional del AIM de ratón mediante un método semejante. Los resultados de la predicción de la estructura tridimensional del AIM de ratón de tipo silvestre se muestran en la Fig. 5. El AIM de ratón de tipo silvestre tiene 8, 9, 8 cisteínas en los respectivos dominios de SRCR (Fig. 6). Se encontró que se usan 8 cisteínas de esas cisteínas para los enlaces disulfuro en los respectivos dominios de SRCR. Sin embargo, los inventores han encontrado que el AIM de ratón de tipo silvestre contiene una cisteína aislada (Cys solitaria) en el dominio SRCR2, concretamente, la cisteína en el aminoácido número 168 del AIM de ratón de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 4: Formación de multímero de rAIM humano mutante

Para verificar la posibilidad de que la cisteína en el aminoácido número 168 y la cisteína en el aminoácido número 277 de AIM humano de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 1 estén implicadas en la multimerización de rAIM humano de tipo silvestre, los inventores prepararon rAIM humanos mutantes en que las cisteínas mencionadas anteriormente se sustituyen por diferentes aminoácidos. Primero, para mantener la función del rAIM humano de tipo silvestre, se estudió el aminoácido que se usará para la sustitución. Dado que la cisteína es hidrófila (se pueden formar enlaces de hidrógeno), de carga eléctrica 0 y no aromática, se seleccionaron serina, treonina, asparagina y glutamina como 4 aminoácidos semejantes. En comparación de la forma y el tamaño molecular, dado que la serina tenía una estructura y propiedades más cercanas a las de la cisteína entre los 4 aminoácidos mencionados anteriormente, se seleccionó la serina como aminoácido a usar para la sustitución. El rAIM humano mutante se preparó como sigue. Es decir, se produjeron respectivamente los vectores de expresión pCAGGS-AIM-2CS humano, pCAGGS-AIM-3CS humano y pCAGGS-AIM-2/3CS humano que expresan respectivamente AIM humano mutante (en lo sucesivo también denominado "2CS" en los Ejemplos 4, 6 y 7) (SEQ ID NO: 3) obtenidos sustituyendo el codón TGC que codifica la cisteína en el aminoácido número 168 del AIM humano de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 1 por TCC, AIM humano mutante (en lo sucesivo también denominado "3CS") (SEQ ID NO: 4) obtenido sustituyendo el codón TGC que codifica la cisteína en el aminoácido número 277 del AIM humano de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 1 por TCC, y el AIM humano mutante que tiene ambas sustituciones antes mencionadas (en lo sucesivo también denominado "2/3CS") (SEQ ID NO: 5). Luego, el vector de expresión se introdujo en células HEK293T mediante un método de electroporación, y se recuperó cada rAIM humano mutante expresado transitoriamente mediante cultivo durante 3 días del sobrenadante del cultivo. Después de ello, cada rAIM humano mutante se purificó y concentró usando una columna de anticuerpos mediante un método semejante al del Ejemplo 1. Las proteínas de rAIM humanas 2CS, 3CS, 2/3CS de tipo silvestre purificadas y concentradas, cada una de 100 ng, se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras basadas en la diferencia en los pesos moleculares, se efectuó tinción de Oriole y se detectó cada proteína de rAIM humana.

Como resultado, 2CS y 3CS obtenidos sustituyendo una cisteína aislada presente en cada uno de los dominios SRCR2 y SRCR3 por serina no formaron un multímero, sino que formaron monómeros y dímeros solos, como el AIM de ratón de tipo silvestre (Fig. 7). Además, 2/3CS obtenido cosustituyendo la cisteína aislada mencionada anteriormente por serina formó solo monómero (Fig. 7). Por lo tanto, se encontró que la multimerización del rAIM humano de tipo silvestre fue causada por la cisteína en el aminoácido número 168 y la cisteína en el aminoácido número 277 del AIM humano de tipo silvestre mostrado en SEQ ID NO: 1. La tasa de recuperación del rAIM purificado final (excluidos los precipitados de rAIM humano de tipo silvestre) del sobrenadante del cultivo fue de 32, 52, 53, 61 % (promedio de la

tasa de recuperación después de 3 veces de expresión transitoria y purificación) en el orden de tipo silvestre, 2CS, 3CS, 2/3CS), y la tasa de recuperación aumentó en el tipo mutante.

Ejemplo 5: Formación de dímero de rAIM de ratón mutante

5 Para verificar la posibilidad de que la cisteína en el aminoácido número 168 de AIM de ratón de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 2 esté implicada en la dimerización de rAIM de ratón de tipo silvestre, los inventores prepararon rAIM de ratón mutante en que la cisteína mencionada anteriormente está sustituida por serina, como en el Ejemplo 4. El rAIM de ratón mutante se preparó como sigue. Es decir, se produjo el vector de expresión pCAGGS-AIM de ratón-2CS que expresa AIM de ratón mutante (en lo sucesivo también denominado "2CS" en los Ejemplos 5, 7) (SEQ ID NO: 6) obtenido sustituyendo el codón TGT que codifica la cisteína en el aminoácido número 168 de AIM de ratón de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 2 por TCT. Luego, el vector de expresión se introdujo en células HEK293T mediante un método de electroporación, y se recuperó del sobrenadante del cultivo el rAIM de ratón mutante expresado transitoriamente mediante cultivo durante 3 días. Después de ello, se purificó y concentró rAIM de ratón mutante usando una columna de anticuerpos mediante un método semejante al del Ejemplo 2. Las proteínas de rAIM de ratón 2CS de tipo silvestre, purificadas y concentradas, cada una de 100 ng, se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras basadas en la diferencia en los pesos moleculares, se efectuó tinción con Oriole y se detectó cada proteína de rAIM de ratón.

Como resultado, el 2CS obtenido al sustituir una cisteína aislada presente en el dominio SRCR2 por serina formó solo un monómero y no formó un dímero (Fig. 8). Por lo tanto, se encontró que la dimerización del rAIM de ratón de tipo silvestre está causada por la cisteína en el aminoácido número 168 del AIM de ratón de tipo silvestre mostrado en la SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 6: Función de rAIM humano mutante

El AIM es captado por diversas células tales como macrófagos, hepatocitos y adipocitos, y ejerce diversas acciones sobre las respectivas células. Los inventores verificaron usando células de macrófagos si cada rAIM humano mutante (2CS, 3CS y 2/3C) perdía la función captados por las células mencionadas anteriormente mediante mutación. Se efectuó el marcaje con FITC en rAIM humano de tipo silvestre y en cada mutante (2CS, 3CS y 2/3C) usando 4-isotiocianato de fluoresceína (Dojindo Laboratories). La tasa de marcaje de cada rAIM humano era semejante. Después de ello, se cocultivó cada rAIM humano durante 30 minutos con macrófagos positivos para F4/80 aislados de la cavidad abdominal de ratones deficientes en AIM en DMEM que contenía FBS al 5 % a una concentración de 20 ug/ml, y se evaluó la reacción de captación de rAIM humano. Las células se recogieron y se lavaron, se analizó la captación intracelular de cada rAIM midiendo la intensidad de fluorescencia media de FITC en macrófagos positivos para F4/80 mediante un citómetro de flujo (BD FACSCelesta).

Como resultado, la captación de cada rAIM humano mutante en los macrófagos no se atenuó en comparación con el rAIM humano de tipo silvestre. Por lo tanto, se considera que cada rAIM humano mutante no estaba funcionalmente atenuado. Por el contrario, curiosamente, los macrófagos captaron 2CS más que el AIM de tipo silvestre (Fig. 9).

Ejemplo 7: Formación de un complejo de pentámero de IgM y rAIM de tipo silvestre o mutante

Se cocultivaron células HEK293T de expresión forzada de IgM y cadena J, y células HEK293T de expresión forzada de rAIM de tipo silvestre o mutante (2CS) durante 24 horas, y las proteínas contenidas en el sobrenadante del cultivo se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Luego, se transcribió la proteína separada en el filtro de membrana, y se verificó si rAIM y el pentámero de IgM formaban un complejo usando un anticuerpo anti-AIM (a-AIM) o un anticuerpo anti-IgM (a-IgM) (ratón (Fig. 10A), humano (Fig. 10B)). Como resultado, tanto en ratones como en humanos, el rAIM de tipo silvestre se unía a IgM, pero 2CS no se unía a IgM.

[Aplicabilidad industrial]

El AIM mutante de la presente invención tiene una función equivalente a la del AIM de tipo silvestre, o tiene una función mejorada, y se caracteriza porque no se multimeriza cuando se expresa como un AIM recombinante. Debido a la ausencia de multimerización, el AIM recombinante no precipita por insolubilización y, como resultado, se mejora la tasa de recuperación del AIM recombinante y se evita el riesgo asociado con la administración in vivo. Además, cuando se administra a un cuerpo vivo, el AIM mutante de la presente invención no forma un complejo con un pentámero de IgM y, por lo tanto, no se inactiva y puede prevenir una disminución en el título.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la apoptosis de macrófagos humano mutante (AIM) que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes (1) a (4) y que tiene una actividad de AIM humano de tipo silvestre
 - 5 (1) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido,
 - (2) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por otro aminoácido,
 - (3) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido, y la cisteína en el aminoácido número 277 está sustituida por otro aminoácido,
 - 10 (4) una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de (1) a (3), que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de (1) a (3) y el otro aminoácido sustituido,

en donde la actividad del AIM humano de tipo silvestre significa al menos una de las actividades seleccionadas del grupo que consiste en: actividad de endocitosis en macrófagos, actividad supresora de apoptosis de macrófagos, actividad de mantenimiento/promoción de arteriosclerosis, actividad supresora de la diferenciación de adipocitos, actividad lipolítica de adipocitos, actividad reductora de adipocitos, actividad de unión a CD36, actividad de endocitosis de adipocitos, actividad de unión a FAS, actividad supresora de la función FAS, actividad antiobesidad, actividad preventiva o terapéutica de enfermedades hepáticas (hígado graso, EHNA, cirrosis hepática o cáncer de hígado) y actividad preventiva o terapéutica de enfermedades renales (insuficiencia renal aguda, nefritis crónica, insuficiencia renal crónica, síndrome nefrótico, nefropatía diabética, nefroesclerosis, nefropatía por IgA, nefropatía hipertensiva, nefropatía asociada a enfermedad del colágeno o nefropatía por IgM).
- 15 2. El AIM humano mutante según la reivindicación 1, en donde dicho otro aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, glutamina, serina y treonina.
3. El AIM humano mutante según la reivindicación 1, en donde dicho otro aminoácido es serina.
- 25 4. Un AIM de ratón mutante que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes (1) a (3) y que tiene una actividad de AIM de ratón de tipo silvestre
 - (1) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2, en donde la cisteína en el aminoácido número 168 está sustituida por otro aminoácido,
 - 30 (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 98 % con la secuencia de aminoácidos de (1), y permanecen las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1) y el otro aminoácido sustituido,
 - (3) una secuencia de aminoácidos según (1) que comprende además la delección, adición, inserción o sustitución de uno a cinco aminoácidos o una combinación de los mismos en una posición distinta de las cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de (1) y el otro aminoácido sustituido,

en donde la actividad del AIM de ratón de tipo silvestre significa al menos una de las actividades seleccionadas del grupo que consiste en: actividad de endocitosis en macrófagos, actividad supresora de apoptosis de macrófagos, actividad de mantenimiento/promoción de arteriosclerosis, actividad supresora de la diferenciación de adipocitos, actividad lipolítica de adipocitos, actividad reductora de adipocitos, actividad de unión a CD36, actividad de endocitosis de adipocitos, actividad de unión a FAS, actividad supresora de la función FAS, actividad antiobesidad, actividad preventiva o terapéutica de enfermedades hepáticas (hígado graso, EHNA, cirrosis hepática o cáncer de hígado) y actividad preventiva o terapéutica de enfermedades renales (insuficiencia renal aguda, nefritis crónica, insuficiencia renal crónica, síndrome nefrótico, nefropatía diabética, nefroesclerosis, nefropatía por IgA, nefropatía hipertensiva, nefropatía asociada a enfermedad del colágeno o nefropatía por IgM).
- 35 5. El AIM de ratón mutante según la reivindicación 4, en donde dicho otro aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, glutamina, serina y treonina.
- 45 6. El AIM de ratón mutante según la reivindicación 4, en donde dicho otro aminoácido es serina.
7. Un ácido nucleico que comprende la secuencia de bases de las siguientes (1) o (2)
 - (1) una secuencia de bases que codifica el AIM humano mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
 - (2) una secuencia de bases que codifica el AIM de ratón mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 7.

9. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión según la reivindicación 8.
 10. Un método para producir un AIM humano mutante o un AIM de ratón mutante, que comprende cultivar la célula hospedadora según la reivindicación 9.
 11. Una composición farmacéutica que comprende un AIM mutante de los siguientes (1) o (2)
- 5 (1) el AIM humano mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
(2) el AIM de ratón mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

Fig. 1

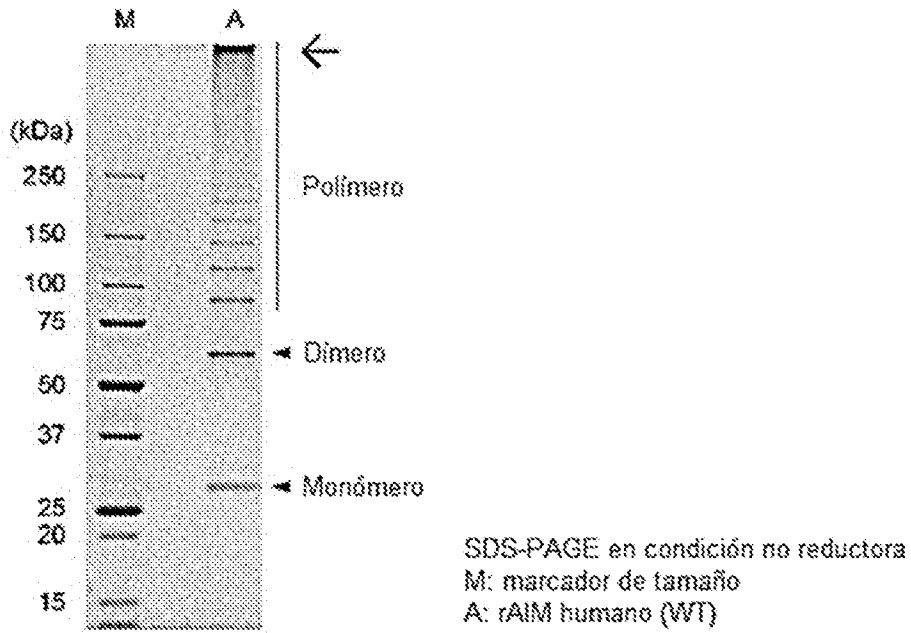


Fig. 2

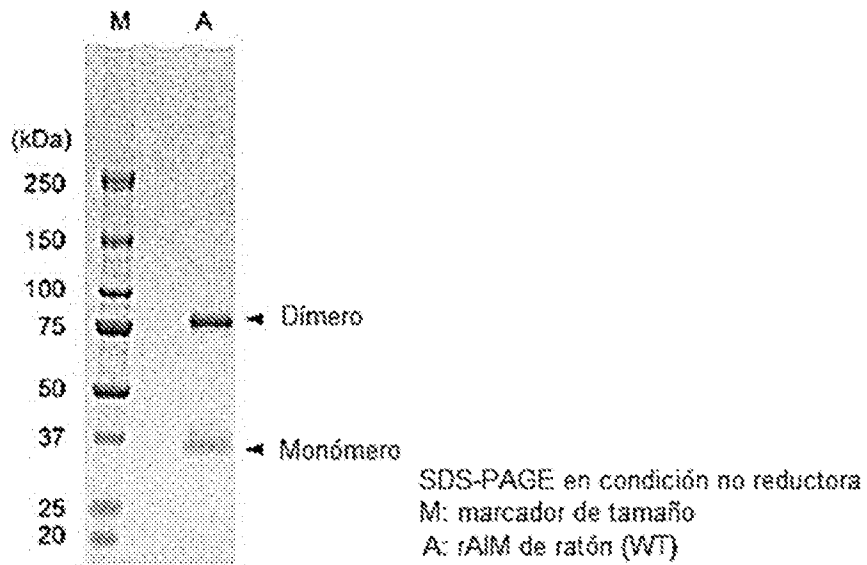


Fig. 3

	WT	NALLFSLI ¹ AI ² CT ³ RF ⁴ LA ⁵ PS ⁶
	2c6	NALLFSLI ¹ AI ² CT ³ RF ⁴ LA ⁵ PS ⁶
	3c5	NALLFSLI ¹ AI ² CT ³ RF ⁴ LA ⁵ PS ⁶
	2/3c5	NALLFSLI ¹ AI ² CT ³ RF ⁴ LA ⁵ PS ⁶
	WT	YRLVGG ¹ LN ² CE ³ GR ⁴ VE ⁵ QK ⁶ Q ⁷ ST ⁸ VC ⁹ DD ¹⁰ ND ¹¹ IK ¹² EV ¹³ VL ¹⁴ CR ¹⁵ EL ¹⁶ CC ¹⁷ GA ¹⁸ ST ¹⁹ PS ²⁰ II ²¹ Y ²² E ²³ P
	2c5	YRLVGG ¹ LN ² CE ³ GR ⁴ VE ⁵ QK ⁶ Q ⁷ ST ⁸ VC ⁹ DD ¹⁰ ND ¹¹ IK ¹² EV ¹³ VL ¹⁴ CR ¹⁵ EL ¹⁶ CC ¹⁷ GA ¹⁸ ST ¹⁹ PS ²⁰ II ²¹ Y ²² E ²³ P
	3c5	YRLVGG ¹ LN ² CE ³ GR ⁴ VE ⁵ QK ⁶ Q ⁷ ST ⁸ VC ⁹ DD ¹⁰ ND ¹¹ IK ¹² EV ¹³ VL ¹⁴ CR ¹⁵ EL ¹⁶ CC ¹⁷ GA ¹⁸ ST ¹⁹ PS ²⁰ II ²¹ Y ²² E ²³ P
	2/3c5	YRLVGG ¹ LN ² CE ³ GR ⁴ VE ⁵ QK ⁶ Q ⁷ ST ⁸ VC ⁹ DD ¹⁰ ND ¹¹ IK ¹² EV ¹³ VL ¹⁴ CR ¹⁵ EL ¹⁶ CC ¹⁷ GA ¹⁸ ST ¹⁹ PS ²⁰ II ²¹ Y ²² E ²³ P
	WT	PAEKE ¹ QV ² L ³ Q ⁴ SV ⁵ CT ⁶ HT ⁷ ED ⁸ TL ⁹ Q ¹⁰ CE ¹¹ Q ¹² EV ¹³ YD ¹⁴ CS ¹⁵ HD ¹⁶ AG ¹⁷ AS ¹⁸ CE ¹⁹ NE ²⁰ SE ²¹ SP ²² Y ²³ EG
	2c5	PAEKE ¹ QV ² L ³ Q ⁴ SV ⁵ CT ⁶ HT ⁷ ED ⁸ TL ⁹ Q ¹⁰ CE ¹¹ Q ¹² EV ¹³ YD ¹⁴ CS ¹⁵ HD ¹⁶ AG ¹⁷ AS ¹⁸ CE ¹⁹ NE ²⁰ SE ²¹ SP ²² Y ²³ EG
	3c5	PAEKE ¹ QV ² L ³ Q ⁴ SV ⁵ CT ⁶ HT ⁷ ED ⁸ TL ⁹ Q ¹⁰ CE ¹¹ Q ¹² EV ¹³ YD ¹⁴ CS ¹⁵ HD ¹⁶ AG ¹⁷ AS ¹⁸ CE ¹⁹ NE ²⁰ SE ²¹ SP ²² Y ²³ EG
	2/3c5	PAEKE ¹ QV ² L ³ Q ⁴ SV ⁵ CT ⁶ HT ⁷ ED ⁸ TL ⁹ Q ¹⁰ CE ¹¹ Q ¹² EV ¹³ YD ¹⁴ CS ¹⁵ HD ¹⁶ AG ¹⁷ AS ¹⁸ CE ¹⁹ NE ²⁰ SE ²¹ SP ²² Y ²³ EG
	WT	YRLADG ¹ FG ² HK ³ GR ⁴ VE ⁵ VK ⁶ HQ ⁷ Q ⁸ RT ⁹ VC ¹⁰ IG ¹¹ HS ¹² LR ¹³ AA ¹⁴ VV ¹⁵ CR ¹⁶ QL ¹⁷ CC ¹⁸ GR ¹⁹ AV ²⁰ LT ²¹ QR ²² RR ²³ HA
	2c5	YRLADG ¹ FG ² HK ³ GR ⁴ VE ⁵ VK ⁶ HQ ⁷ Q ⁸ RT ⁹ VC ¹⁰ IG ¹¹ HS ¹² LR ¹³ AA ¹⁴ VV ¹⁵ CR ¹⁶ QL ¹⁷ CC ¹⁸ GR ¹⁹ AV ²⁰ LT ²¹ QR ²² RR ²³ HA
	3c5	YRLADG ¹ FG ² HK ³ GR ⁴ VE ⁵ VK ⁶ HQ ⁷ Q ⁸ RT ⁹ VC ¹⁰ IG ¹¹ HS ¹² LR ¹³ AA ¹⁴ VV ¹⁵ CR ¹⁶ QL ¹⁷ CC ¹⁸ GR ¹⁹ AV ²⁰ LT ²¹ QR ²² RR ²³ HA
	2/3c5	YRLADG ¹ FG ² HK ³ GR ⁴ VE ⁵ VK ⁶ HQ ⁷ Q ⁸ RT ⁹ VC ¹⁰ IG ¹¹ HS ¹² LR ¹³ AA ¹⁴ VV ¹⁵ CR ¹⁶ QL ¹⁷ CC ¹⁸ GR ¹⁹ AV ²⁰ LT ²¹ QR ²² RR ²³ HA
	WT	YGRKPI ¹ WLS ² Q ³ SC ⁴ RE ⁵ AT ⁶ LQ ⁷ DC ⁸ PS ⁹ PG ¹⁰ RR ¹¹ NT ¹² CR ¹³ HD ¹⁴ ET ¹⁵ Y ¹⁶ CE ¹⁷ EP ¹⁸ ED
	2c5	YGRKPI ¹ WLS ² Q ³ SC ⁴ RE ⁵ AT ⁶ LQ ⁷ DC ⁸ PS ⁹ PG ¹⁰ RR ¹¹ NT ¹² CR ¹³ HD ¹⁴ ET ¹⁵ Y ¹⁶ CE ¹⁷ EP ¹⁸ ED
	3c5	YGRKPI ¹ WLS ² Q ³ SC ⁴ RE ⁵ AT ⁶ LQ ⁷ DC ⁸ PS ⁹ PG ¹⁰ RR ¹¹ NT ¹² CR ¹³ HD ¹⁴ ET ¹⁵ Y ¹⁶ CE ¹⁷ EP ¹⁸ ED
	2/3c5	YGRKPI ¹ WLS ² Q ³ SC ⁴ RE ⁵ AT ⁶ LQ ⁷ DC ⁸ PS ⁹ PG ¹⁰ RR ¹¹ NT ¹² CR ¹³ HD ¹⁴ ET ¹⁵ Y ¹⁶ CE ¹⁷ EP ¹⁸ ED
	WT	LRLVGG ¹ ML ² CS ³ GR ⁴ LE ⁵ VL ⁶ HK ⁷ Y ⁸ PS ⁹ VC ¹⁰ DR ¹¹ NG ¹² KE ¹³ ED ¹⁴ VV ¹⁵ CR ¹⁶ QL ¹⁷ CC ¹⁸ GR ¹⁹ SL ²⁰ SP ²¹ FR ²² DR ²³ KY
	2c5	LRLVGG ¹ ML ² CS ³ GR ⁴ LE ⁵ VL ⁶ HK ⁷ Y ⁸ PS ⁹ VC ¹⁰ DR ¹¹ NG ¹² KE ¹³ ED ¹⁴ VV ¹⁵ CR ¹⁶ QL ¹⁷ CC ¹⁸ GR ¹⁹ SL ²⁰ SP ²¹ FR ²² DR ²³ KY
	3c5	LRLVGG ¹ ML ² CS ³ GR ⁴ LE ⁵ VL ⁶ HK ⁷ Y ⁸ PS ⁹ VC ¹⁰ DR ¹¹ NG ¹² KE ¹³ ED ¹⁴ VV ¹⁵ CR ¹⁶ QL ¹⁷ CC ¹⁸ GR ¹⁹ SL ²⁰ SP ²¹ FR ²² DR ²³ KY
	2/3c5	LRLVGG ¹ ML ² CS ³ GR ⁴ LE ⁵ VL ⁶ HK ⁷ Y ⁸ PS ⁹ VC ¹⁰ DR ¹¹ NG ¹² KE ¹³ ED ¹⁴ VV ¹⁵ CR ¹⁶ QL ¹⁷ CC ¹⁸ GR ¹⁹ SL ²⁰ SP ²¹ FR ²² DR ²³ KY
	WT	GRVGR ¹ WLD ² NY ³ RS ⁴ SE ⁵ EE ⁶ SL ⁷ QQ ⁸ RR ⁹ NG ¹⁰ FR ¹¹ DC ¹² TR ¹³ Q ¹⁴ ED ¹⁵ Y ¹⁶ IV ¹⁷ CS ¹⁸ Q
	2c5	GRVGR ¹ WLD ² NY ³ RS ⁴ SE ⁵ EE ⁶ SL ⁷ QQ ⁸ RR ⁹ NG ¹⁰ FR ¹¹ DC ¹² TR ¹³ Q ¹⁴ ED ¹⁵ Y ¹⁶ IV ¹⁷ CS ¹⁸ Q
	3c5	GRVGR ¹ WLD ² NY ³ RS ⁴ SE ⁵ EE ⁶ SL ⁷ QQ ⁸ RR ⁹ NG ¹⁰ FR ¹¹ DC ¹² TR ¹³ Q ¹⁴ ED ¹⁵ Y ¹⁶ IV ¹⁷ CS ¹⁸ Q
	2/3c5	GRVGR ¹ WLD ² NY ³ RS ⁴ SE ⁵ EE ⁶ SL ⁷ QQ ⁸ RR ⁹ NG ¹⁰ FR ¹¹ DC ¹² TR ¹³ Q ¹⁴ ED ¹⁵ Y ¹⁶ IV ¹⁷ CS ¹⁸ Q

Péptido señal

Domínio SRCR1

Domínio SRCR2

Domínio SRCR3

Fig. 4

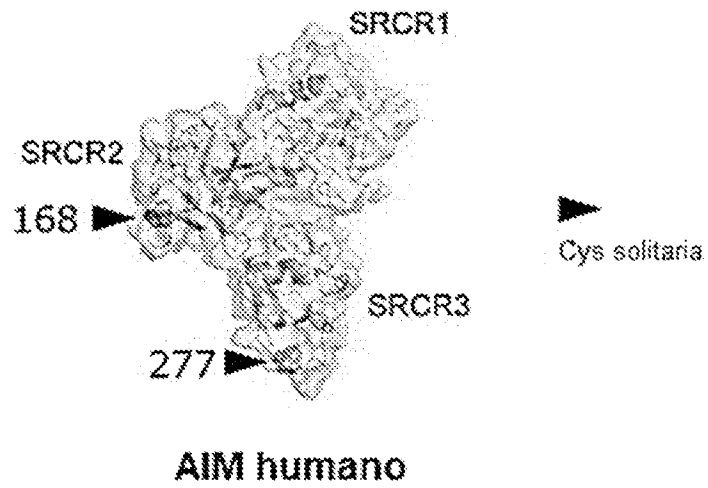


Fig. 5

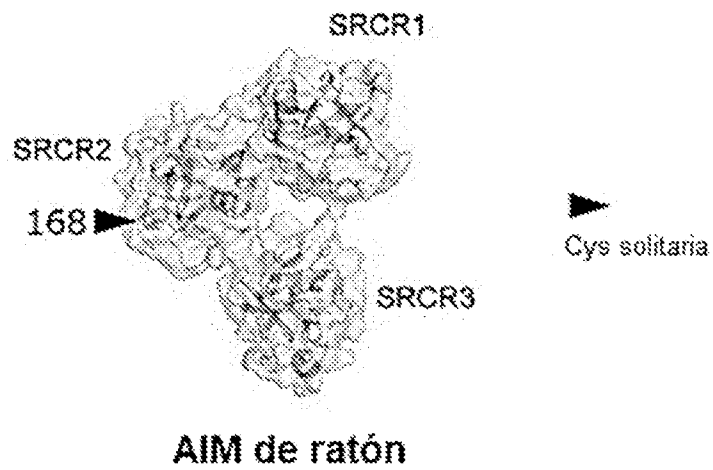


Fig. 6

Péptido señal	WT	MAPLFNIMLALLSIFVGS	CFSESPTK
	ZCS	MAPLFNIMLALLSIFVGS	CFSESPTK
Domínio SRCR1	WT	VQLVGGARCEGRVEVEHNGQNGTVCDDGWRDRDVAVVCRELNCGAVICTPRGASVQF	
	ZCS	VQLVGGARCEGRVEVEHNGQNGTVCDDGWRDRDVAVVCRELNCGAVICTPRGASVQF	
	WT	PASEQRVLIQSVDCNGTEDTLAQCELNYDFDCSHEEDAGAQQE	<u>NPDSDLLELPEE</u>
	ZCS	PASEQRVLIQSVDCNGTEDTLAQCELNYDFDCSHEEDAGAQQE	<u>NPDSDLLELPEE</u>
Domínio SRCR2	WT	VRLVDGPGHCQGRVEVLHQSQNSTVCKAGNWLQVSKVVCRLGCGRALLTYGSSCKNKT	
	ZCS	VRLVDGPGHCQGRVEVLHQSQNSTVCKAGNWLQVSKVVCRLGCGRALLTYGSSCKNKT	
	WT	QKKGPIWMGRMSSCGQEANLRSCLLSRIENNCTHGEDTWMECE	<u>DEFE</u>
	ZCS	QKKGPIWMGRMSSCGQEANLRSCLLSRIENNCTHGEDTWMECE	<u>DEFE</u>
	WT	LKLVGGDTFCSGRLEVLHKGSWGVCDDNWGEEKEDQVYCKQLGCGKSLHPSPKTKIY	
	ZCS	LKLVGGDTFCSGRLEVLHKGSWGVCDDNWGEEKEDQVYCKQLGCGKSLHPSPKTKIY	
Domínio SRCR3	WT	GPCAGRINLDDVNCSGKEQSLEFCRHRINGYHDCTHKEDVEVICT	<u>DEFDY</u>
	ZCS	GPCAGRINLDDVNCSGKEQSLEFCRHRINGYHDCTHKEDVEVICT	<u>DEFDY</u>

Fig. 7

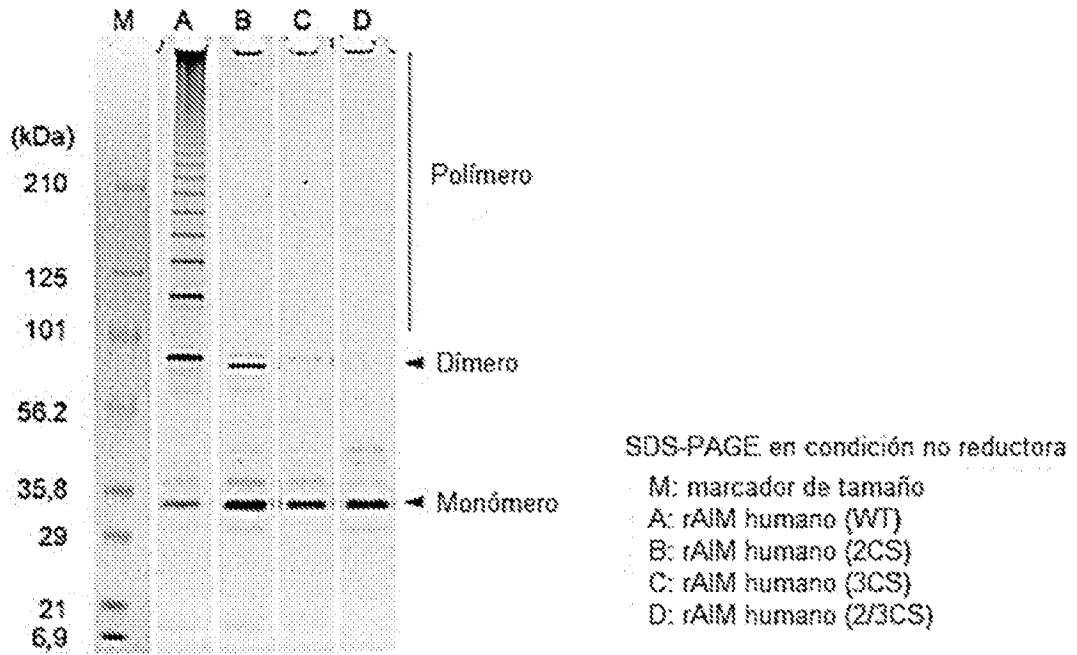


Fig. 8

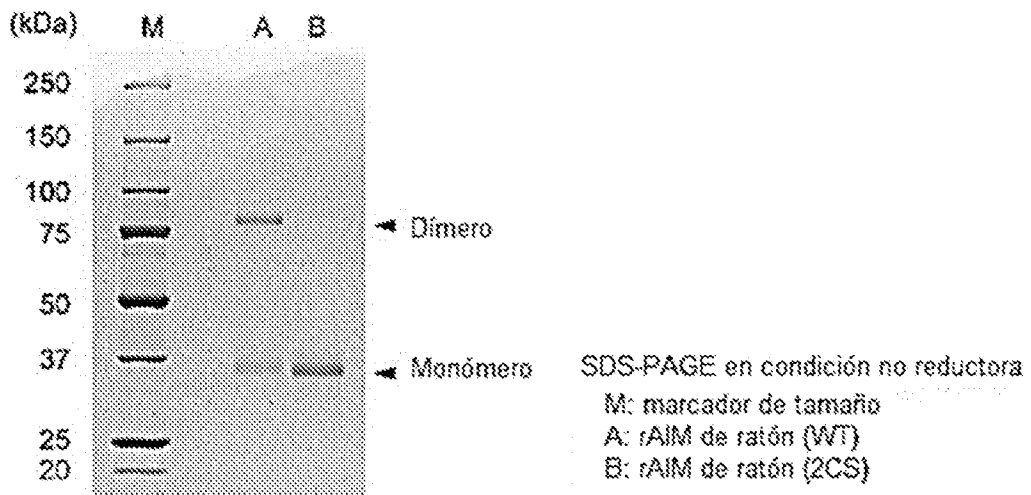


Fig. 9

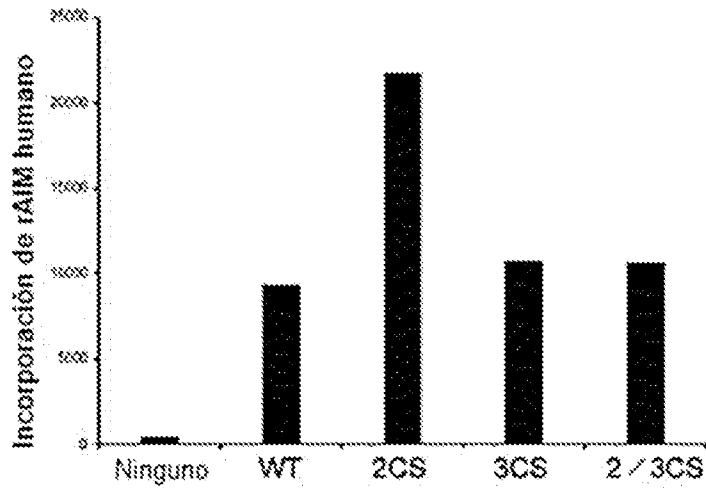


Fig. 10

