



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 427**

51 Int. Cl.:
C12N 15/67 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04020455 .4**
96 Fecha de presentación : **27.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1630232**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

54 Título: **Secuencias de nucleótidos optimizadas que codifican para sgp130.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73 Titular/es: **CONARIS research institute AG.**
Schauenburgerstrasse 116
24118 Kiel, DE

72 Inventor/es: **Seegert, Dirk;**
Wätzig, Georg;
Rahaus, Nikolaus;
Daecke, Jessica y
Rose-John, Stefan

74 Agente: **Arizti Acha, Mónica**

ES 2 309 427 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

Secuencias de nucleótidos optimizadas que codifican para sgp130.

5 La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican para sgp130 con codones optimizados, tal como se caracterizan en las reivindicaciones así como a un método para la producción recombinante sumamente eficaz de sgp130 en células de mamífero usando una molécula de ácido nucleico de la invención.

10 Para el tratamiento de diversas enfermedades tales como enfermedad de Crohn etc. puede ser deseable para el tratamiento el bloqueo específico de las respuestas de IL-6 dependientes del IL-6R soluble. Se encontró que un dímero de gp130 soluble, en particular una proteína de fusión IgG-Fc o una versión PEGilada de sgp130, inhibe de manera eficaz el efecto antiapoptótico del sIL-6R de las LPMC de los pacientes con enfermedad de Crohn (EC) y que, por tanto, dicho compuesto es útil para el tratamiento de dicha enfermedad y enfermedades relacionadas como, por ejemplo, colitis o artritis reumatoide. Desafortunadamente, hasta el momento la producción recombinante de sgp130 es difícil, 15 en particular debido al hecho de que sólo pueden obtenerse bajas cantidades de proteína.

El documento US 2002/012962 da a conocer una proteína de fusión gp130-Fc humana y la producción de dicha proteína en células de mamífero (células CHO, 293).

20 El documento WO 95/33059 da a conocer un fragmento N-terminal de gp130 y la secuencia de nucleótidos que lo codifica. Chow *et al.*, Biochemistry, American Chemical Society, Easton, PA, EE.UU., vol. 40(25), (2001), 7593-7603 dan a conocer una gp130 soluble (D1-D3) llamada gp130-IGD-CHR que comprende los aminoácidos 1-291 de la gp130 humana. Horsten *et al.*, FEBS LETTERS 360(1) (1995), 43-46 dan a conocer un D1-D3 de gp130 soluble fusionado con Fc, que comprende los residuos 1-301 de la gp130 humana. Ancey *et al.*, J. Biol. Chem. 278(19), 16968-72 dan a conocer una proteína de fusión de gp130 (D1-D3) fusionada con dominios D2-D3 del IL-6R-alfa. Tanaka *et al.*, J. Clin. Invest. 106 (2000), 137-44 dan a conocer una proteína de fusión RAPS-(D1-D3) de gp130 soluble. Los documentos WO 95/33059, EP-A1 148 065 y Kallen *et al.*, Biochemica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research 1592(3) (2002) 1323-43 dan a conocer proteínas de fusión de la parte extracelular de la gp130 humana con Fc. 25

30 Sin embargo, ninguno de dichos documentos da a conocer cómo optimizar codones de los ácidos nucleicos que codifican para sgp130Fc para su expresión eficaz en células de mamífero.

35 Por tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención era proporcionar medios que permitan mejorar la eficacia de producción recombinante de sgp130Fc.

La solución de dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Durante los experimentos que condujeron a la presente invención se descubrió que mediante el uso de versiones con codones optimizados particulares del ADN que codifica para sgp130Fc pueden aumentarse los rendimientos de proteína recombinante al menos de 10 a 20 veces en comparación con la versión no modificada del ADN. 40

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

45 *Representación esquemática de los constructos*

El sombreado en gris marca las partes de la proteína que se han optimizado. (A) Constructo eucariota que comprende un péptido señal, seis dominios de gp130 extracelulares y la parte de IgG-Fc. (B) Variaciones de la proteína sgp130 expresada en células procariotas. sgp130 puede expresarse con o sin secuencia líder N-terminal y/o etiqueta C-terminal para fines de purificación. 50

Figura 2

55 *sgp130(D1-D3) (secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos) para su expresión en células bacterianas*

Se muestra una alineación de la secuencia de nucleótidos con codones optimizados (sgp130(D1-D3)_opt) frente a la secuencia original (sgp130(D1-D3)_wt).

60 Figura 3

sgp130Fc (secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos) para su expresión en células de mamífero

65 Se muestra una alineación de la secuencia de nucleótidos con codones optimizados (sgp130Fc_opt) frente a la secuencia original (sgp130Fc_wt).

Figura 4

Detección de *sgp130Fc* tras transfección transitoria de células HEK293 (A) o células CHO (B) con plásmidos de expresión de *sgp130Fc* de tipo natural u optimizado (opt)

La posición de *sgp130Fc* se indica mediante flechas (◄). Se detectó la expresión de *sgp130Fc* de tipo natural y optimizada en dos experimentos de transfección independientes de cada una. Los diferentes tamaños de la proteína (panel izquierdo) resultan de la secuencia líder que se ha escindido parcialmente tras la secreción hacia el medio. El panel derecho representa los resultados derivados de extractos de células completas de células CHO (*sgp130Fc* son secuencia líder).

Figura 5

Detección de ARN transcrito a partir de ADN de plásmido transfectado (*sgp130Fc*; gen de resistencia a neomicina (NeoR)) mediante RT-PCR específica de gen

Se transfectaron células HEK293 con un plásmido de expresión que codifica para *sgp130Fc* o bien de tipo natural o bien optimizado. Además ambos plásmidos codifican para un gen de resistencia a neomicina (NeoR). La transfección del vector vacío (mock) o células no transfectadas (control) sirvió como controles negativos. Se amplificó β -actina a partir del ARN total para demostrar el uso de cantidades iguales de ARN en cada experimento individual.

Por tanto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para *sgp130* que comprende la secuencia de ácido nucleico (a) tal como se representa en la figura 3 (*sgp130Fc_opt*) o (b) un fragmento de la misma que mantiene el patrón de utilización de codones de la misma. La letra “s” de *sgp130* significa “soluble”. El término “soluble” tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de *gp130* que carece del dominio intracelular y del dominio transmembrana.

El término “fragmento” tal como se usa en el presente documento se refiere a fragmentos de *sgp130* que comprenden la totalidad o partes más pequeñas del ADNc optimizado que codifica para el dominio extracelular de *gp130*. Preferiblemente, tales fragmentos muestran una actividad biológica de la molécula de longitud completa, por ejemplo, mantienen la capacidad para inhibir la actividad del complejo agonista IL-6/sIL-6R. Para la expresión en bacterias tal fragmento comprende también *sgp130* sin la secuencia líder secretora eucariota (MLTLQTWVVQALFIFLTTESTG, posiciones 1 a 22). Además, una secuencia líder secretora procariota, por ejemplo *pelB* o *OmpA* podría clonarse delante de la secuencia de *sgp130* o partes de la misma y podría derivarse del plásmido de expresión adecuado respectivo, por ejemplo pET22b (Merck Biosciences GmbH, Bad Soden, Alemania), pASK-IBA2, pASK-IBA12 (IBA, Goettingen, Alemania). Además, la proteína *sgp130* puede expresarse con o sin etiqueta para fines de purificación, por ejemplo His₆, Strep, Myc u otras.

Alternativamente, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico, en la que está presente al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% y, lo más preferiblemente al menos el 98% de los codones alterados en la secuencia de ácido nucleico de la figura 3 frente a la secuencia de tipo natural.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico de la presente invención es una molécula de ADN.

La presente invención incluye vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la invención. Los vectores de expresión pueden construirse según métodos bien conocidos para el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. Los “elementos de control” o “secuencias reguladoras” utilizados para la expresión recombinante son aquellas regiones no traducidas de los promotores, potenciadores de vector, regiones no traducidas en 5' y 3' que interaccionan con proteínas de célula huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. La fuerza y la especificidad de tales elementos pueden variar. Dependiendo del sistema de vector y del huésped utilizados, puede usarse cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. En sistemas de célula de mamífero, son preferibles promotores de genes de mamífero o de virus de mamífero. Pueden seleccionarse promotores y otras señales de regulación de la expresión para que sean compatibles con la célula huésped para la que se diseña la expresión. Por ejemplo, los promotores de mamífero incluyen el promotor de metalotioneína, que puede inducirse en respuesta a metales pesados tales como cadmio, y el promotor de β -actina 30. También pueden usarse promotores virales tales como promotor de antígeno T grande de VS40, promotor inmediato temprano (IT) de citomegalovirus (CMV) humano, promotor LTR de virus del sarcoma de Rous, promotor de adenovirus, o un promotor de VPH, particularmente la región reguladora en sentido 5' (URR, *upstream regulatory region*) de VPH. Todos estos promotores están bien descritos y fácilmente disponibles en la técnica.

En células huésped de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión de base viral. En los casos en que se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican para el/los polipéptido(s) de la presente invención pueden estar ligadas en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia líder triparental. Puede usarse la inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral para obtener un virus viable que puede expresar el anticuerpo en células huésped infectadas (Logan, J. y Shenk, T.

(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659). Además, pueden usarse los potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador de virus del sarcoma de Rous (VSR), para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

Otros ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores virales de herpes simple, vectores de alfavirus o vaccinia y retrovirus, incluyendo lentivirus y virus adenoasociados. Los expertos en la técnica conocen técnicas de transferencia génica que utilizan estos virus. Por ejemplo pueden usarse vectores de retrovirus para integrar de manera estable las moléculas de ácido nucleico de la invención en el genoma del huésped, aunque tal recombinación no se prefiere. Por el contrario, vectores de adenovirus defectuosos en la replicación permanecen episomales y por tanto permiten una expresión transitoria. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica para los polipéptidos de sgp130, pueden usarse vectores a base de VS40 o VEB con un marcador seleccionable apropiado.

También pueden emplearse cromosomas artificiales humanos (CAH) para suministrar fragmentos más grandes de ADN que pueden estar contenidos y expresarse en un plásmido. Los CAH de 6 a 10 M se construyen y suministran mediante métodos de suministro convencionales (liposomas, aminopolímeros policatiónicos o vesículas) para fines terapéuticos.

También pueden usarse señales de iniciación específicas para conseguir una traducción más eficaz. Tales señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. En casos en los que las secuencias que codifican para la sgp130, su codón de iniciación y secuencias en sentido 5' se insertan en el vector de expresión apropiado, pueden no necesitarse señales adicionales de control de la transcripción o la traducción. Sin embargo, en caso en el que sólo se inserta una secuencia codificante para un fragmento, deben proporcionarse señales exógenas de control de la traducción incluyendo el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para garantizar la traducción de todo el inserto. Los codones de iniciación y elementos de traducción exógenos pueden ser de diversos orígenes, tanto natural como sintético. La eficacia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores que son apropiados para el sistema celular particular que se usa, tal como los descritos en la bibliografía (Scharf, D. *et al.* (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162).

Además, puede seleccionarse una cepa de células huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar las cadenas polipeptídicas expresadas de la manera deseada. También puede usarse procesamiento postraducciona que escinde una forma "prepro" del polipéptido para facilitar la inserción, el plegamiento y/o la función correctos. Diferentes células huésped de mamífero que tienen los mecanismos característicos y la maquinaria celular específicos para actividades postraduccionales (por ejemplo, CHO, HeLa, MDCK, HEK293, 293, COS-7 y W138), están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Bethesda, Md.) y pueden seleccionarse para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de las cadenas polipeptídicas extrañas.

Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento de sgp130, se prefiere la expresión estable en células de mamífero. Por ejemplo, pueden transfectarse líneas celulares que expresan de manera estable sgp130Fc usando vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación virales y/o elementos de expresión endógenos y uno o más genes de marcador seleccionable en el mismo o en un vector separado. Tras la introducción del vector, puede dejarse crecer a las células durante 1-2 días en medios enriquecidos antes de cambiarlos a medios selectivos. El fin del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de las células que expresan de manera satisfactoria las secuencias introducidas. Puede hacerse proliferar a los clones resistentes de células transformadas adecuadas usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula.

Tras la introducción del/de los vector(es) recombinante(s), se hacen crecer las células huésped en un medio selectivo, que selecciona el crecimiento de células que contienen vector. Puede usarse cualquiera de varios sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero no se limitan a, los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler, M. *et al.* (1977) Cell 11:223-32) y genes de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, I. *et al.* (1980) Cell 22:817-23) que pueden emplearse en células de tk.sup.- o aprt.sup.-, respectivamente. Además puede usarse resistencia a herbicidas, antibióticos o antimetabolitos como la base para la selección; por ejemplo, dhfr que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, M. *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglicósidos neomicina y G-418 (Colbere-Garapin, F. *et al.* (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14) y als o pat, que confieren resistencia a clorsulfurón y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, citado anteriormente). Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman, S. C. y R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-51). Recientemente, el uso de marcadores visibles ha ganado popularidad con marcadores tales como antocianinas, beta-glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, usándose ampliamente no sólo para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes, C. A. *et al.* (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131).

La purificación de la sgp130 recombinante se lleva a cabo mediante uno cualquiera de los métodos conocidos para este fin, es decir, cualquier procedimiento convencional que implique extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis, o similar. Un procedimiento de purificación adicional que puede usarse es cromatografía de afinidad usando anticuerpos monoclonales que se unen al polipéptido diana o una etiqueta fusionada con el mismo, por ejemplo, His, Strep o Myc, y que se producen e inmovilizan sobre una matriz de gel contenida dentro de una columna. Las preparaciones impuras que contienen la sgp130 recombinante se hacen pasar a través de la columna. La sgp130 se

unirá a la columna mediante el anticuerpo específico mientras que las impurezas pasarán a su través. Tras lavar, el polipéptido se eluye del gel mediante un cambio en el pH o la fuerza iónica y entonces, si se desea, puede dimerizarse y/o PEGilarse.

- 5 Por consiguiente, la presente invención se refiere también a un método de producción de la sgp130 de la presente invención, que comprende cultivar una célula huésped transformada con una molécula de ácido nucleico de la invención y recuperar el polipéptido de sgp130 a partir de dicha célula huésped o del cultivo.

10 El polipéptido de sgp130 producido a partir de una molécula de ácido nucleico de la presente invención es útil en el tratamiento y/o la prevención de todas las patologías en las que debe inhibirse la actividad del complejo agonista IL-6/sIL6R, por ejemplo, para el tratamiento/la prevención de resorción ósea, hipercalcemia, caquexia, tumores (tales como cáncer de colon), enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo lupus eritematoso sistémico, LES), inflamaciones crónicas (tales como enfermedad de Crohn o artritis reumatoide) e infecciones bacterianas o virales.

15 Los ejemplos siguientes explican la invención en más detalle.

Ejemplo 1

20 *Material y Métodos*

(A) *Constructo y transfección*

Se clonó el ADNc que codifica para sgp130Fc o bien de tipo natural o bien optimizado en el plásmido de expresión pDEST40 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según procedimientos convencionales. La secuencia de tipo natural se derivó de un plásmido de expresión que se ha descrito en Jostock *et al.*, Eur. J. Biochem. 268 (2001), 160-7 (Figura 1; panel superior). Se verificó la secuencia del constructo. Se transfectaron de manera transitoria 3×10^5 células HEK293 con 1 μ g de plásmido y 3 μ l de Eugene (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en 3 ml de medio según el manual del fabricante. Posteriormente se incubaron las células durante 24 h a 37°C y se recogieron los sobrenadantes y las células para preparaciones adicionales o bien de proteínas o bien de ARN totales, respectivamente.

Se transfectó un conjunto de células con el vector vacío (mock), otro conjunto de células se dejó sin transfectar (control). Ambos conjuntos sirvieron como controles negativos.

35 (B) *Extracción de proteína e inmunotransferencia de tipo Western*

Se precipitó la proteína sgp130Fc en los sobrenadantes celulares añadiendo 20 μ l de proteína-A/G-Plus Agarosa (Santa Cruz, CA, EE.UU.). Se incubó la suspensión durante la noche a 4°C y finalmente se centrifugó. Se extrajeron las proteínas unidas mediante ebullición del sedimento de agarosa en tampón de muestra de SDS durante 5 minutos a 100°C. En paralelo se rascaron las células de las placas usando un polímero de caucho, se recogieron en 100 μ l de PBS y se centrifugaron. Se separaron todas las muestras de proteína sobre un gel de acrilamida convencional, se transfirieron a una membrana de PDVF mediante transferencia semiseca y se tiñeron con un anticuerpo específico de gp130 (Hölzel Diagnostika, Colonia, Alemania). 50 ng de sgp130 recombinante sirvieron como control positivo (sgp130).

45 (C) *Extracción de ARN*

Se extrajo el ARN total de los sedimentos celulares usando un kit RNeasy Mini (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se usaron los siguientes cebadores para determinar el ARN transcrito a partir del ADN de plásmido transfectado mediante RT-PCR: sgp130Fc_f: 5'-ATGAGGTGTGAGTGGGATGG-3', sgp130Fc_r: 5'-ACCTTG CACTTGACTCCTTGC-3'; gen de resistencia a neomicina NeoR_s: 5'-GATGCCTGCTTGCCGAATATC-3'; NeoR_r: 5'-CGCCAAGCTCTTCAGCAATATC-3'. Inicialmente se realizó la transcripción inversa del ARN total y se amplificó el ADNc mediante 30 ciclos de 30 segundos a 95°C seguido de 2 minutos a 57°C y una etapa de elongación final de 5 minutos a 72°C. Tamaños de amplicón esperados: gp130: 1.712 pb, NeoR: 133 pb. Se realizó la amplificación de NeoR para documentar una eficacia de transfección igual del plásmido. Además, se amplificó β -actina para demostrar el uso de cantidades iguales de ARN total en cada experimento.

Ejemplo 2

Producción recombinante sumamente eficaz de sgp130Fc en células HEK293

60 La figura 4 demuestra que en comparación con el plásmido de expresión de tipo natural la producción de sgp130Fc se aumentó al menos de 10 a 20 veces en células HEK293 transfectadas con el plásmido de expresión de sgp130Fc optimizado. En el nivel de ARN (figura 5) se detectó un aumento similar de la expresión de sgp130Fc con el constructo optimizado. Este aumento de cantidades de ARN de sgp130Fc no se debió a una eficacia de transfección diferente tal como se muestra mediante cantidades iguales de ARN codificado por el gen de resistencia a neomicina que estaba situado también en el plásmido de expresión.

ES 2 309 427 T3

Los resultados indican que el aumento significativo de la producción de sgp130Fc tras la optimización de la secuencia de ADNc se basa parcialmente en una utilización de codones mejorados durante la traducción pero se deriva principalmente de la elevación de los niveles de ARN correspondientes. Esto puede deberse a una transcripción más eficaz o a una mayor estabilidad del ARN.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Molécula de ácido nucleico que codifica para sgp130 que comprende (a) la secuencia de ácido nucleico tal como se representa en la figura 3 (sgp130Fc_opt) o (b) un fragmento de la misma que mantiene la capacidad para inhibir la actividad del complejo agonista IL-6/sIL-6R.

2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que está presente al menos el 80% de los codones alterados en la secuencia de ácido nucleico de la figura 3 frente a la secuencia de tipo natural.

10 3. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2, que es una molécula de ADN.

4. Vector de expresión que contiene una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

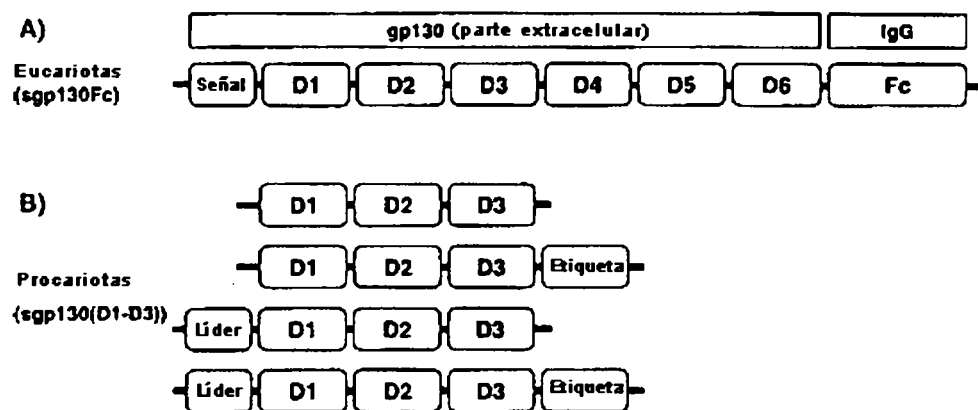
15 5. Célula huésped que contiene un vector de expresión según la reivindicación 4.

6. Célula huésped según la reivindicación 5, que es una célula huésped de mamífero.

20 7. Célula huésped según la reivindicación 6, que es una célula CHO o HEK293.

8. Método de producción de un polipéptido de sgp130 que comprende cultivar una célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 y recuperar el polipéptido a partir de dicha célula huésped o del cultivo.

Figura 1



```

esp130(D1-D3)_wt      n° 1  ATGAACTTC TAGATCCATG TGGTATATC AGTCCTGAT CTGAGTGTG AGACTTATC TCTATTTCA CTGAGTTTG TGTCTTAAg GAAATATTA TGGATTATT
                             M E L L D P C G Y I S P E S P V V Q L H S M F T A V C V L K E K C M D Y F

esp130(D1-D3)_opt     n° 1  ATGGAACTGC TGGAGCCGTC CGGTATATC AGCCCGGAAA GCCCACTTGT TCACTGCAAT AGCAATTTCA CCGGCTTTG TGTCTGAAA GAGAACTGTA TGGATTATT
                             M E L L D P C G Y I S P E S P V V Q L H S M F T A V C V L K E K C M D Y F

-----

esp130(D1-D3)_wt      n° 111 TCAATGTAAT GCTATATTCA TTGTCTGGA AACAAACAT TTATCTATC CTAGAGGCA ATATACTAC ATTAACAGA CAGCATCCAG TGTCACTTT ACAGATATG
                             K V N A N Y I V W K T N H F T I P K E Q Y T I I M R T A S S V T F T D I A

esp130(D1-D3)_opt     n° 111 CGAAGTAAc GCAAACTACA TTGTCTGGA AACAAACAT TTCAACATC CBAAGACA CTATACATC CCGAGAGAG CATTACCTTT ACCGATATG
                             K V N A N Y I V W K T N H F T I P K E Q Y T I I M R T A S S V T F T D I A

-----

esp130(D1-D3)_wt      n° 221 CTTCATTAA TATTGAGTC AGTTGAAcA TTCTTACTT CGGAGAGCTT GAAAGAAAG TTATGGAAT GAAATTAAT TCGGCTTTC CTTCAGAAA ACCTAAAAAT
                             S L N I Q L T C N I L T F G Q L E Q N V Y G I T I I S G L P P E K P K N

esp130(D1-D3)_opt     n° 221 CGAGCTGAA CATTGAACTG AGTTGAAcA TTCTGACTT CGATCACTG GAAAGAAAG TTATGGAAT GAAATTAAT AGCGCTTTC CCGCGAAA ACCGAAAT
                             S L N I Q L T C N I L T F G Q L E Q N V Y G I T I I S G L P P E K P K N

-----

esp130(D1-D3)_wt      n° 331 TTGAGTTGCA TTGTGAACGA GCGGAAGAA ATGAGTGTG AGTGGATG TGGAGGGA ACACTTTC AGCAAACTT CACTTTAAA TCTGATCCG CAACACAA
                             L S C I V N E G K K M R C E W D G G R E T H L E T N F T L K S E W A T H K

esp130(D1-D3)_opt     n° 331 CTGAGCTGCA TTGTGAACGA AGCGAAAA ATGAGTGTG AGTGGATG TGGTGGGA ACCGCTTC AGCAAACTT CACTCTGAA ACCGATTCG CGACCGAA
                             L S C I V N E G K K M R C E W D G G R E T H L E T N F T L K S E W A T H K

```

Fig. 2

89p130 (D1-D3)_wt n° 441 GTTTCCTGAT TGCNAGCAA AACGTGACAC CCCCACTCA TGCACGTG TGACGTGTTT ATATATCTAC TGTGTATTTT GTGCACATTC AAGTCTGGGT AGNAGCAGAG AATGCCCTTG
 F A D C K A K R D T P T S C T V D Y S T V Y F V N I E V N V E A E N A L G
 89p130 (D1-D3)_opt n° 441 AATTTCGGAT TGCNAGCGA AACGCCATAC CCCGACTCT TGCACGGTTG ATTACGACAC CGTGTACTTC GTGCACATTC AAGTCTGGGT CGNAGCGCAA AAGGCCCTGG
 F A D C K A K R D T P T S C T V D Y S T V Y F V N I E V N V E A E N A L G

89p130 (D1-D3)_wt n° 551 GCAAGCTTAC ATCAGATCAT ATCAATTTTG ATCTGTATA TAAAGTGAAG CCGCATCCGC CACATAATTT ATCAGTGATC AACTCAGAGG AACTGTCTAG TATCTTAAA
 K V T S D H I N F D P V Y K V K P N P P H N L S V I N S E E L S S I L K
 89p130 (D1-D3)_opt n° 551 GTAAAGTCAC CAGCATCAT ATCACTTTG ATCGGTGTA CAAAGTGAAA CCGCATCCGC CCGATAATCT GAGCTGATC AAGCAGGAAG AACTCAGCAG CATCTGTAAA
 K V T S D H I N F D P V Y K V K P N P P H N L S V I N S E E L S S I L K

89p130 (D1-D3)_wt n° 661 TTGACATGCA CCAACCGAG TATTAAGCT GTTATAATAC TAAATATAA CATTCAAT AGGACCGAAG ATGCTCAAC TTGGAGCCAG ATTCTCTCTG AAGNCACAGC
 L T W T N P S I K S V I I L K Y N I Q Y R T K D A S T W S Q I P E D T A
 89p130 (D1-D3)_opt n° 661 CTGACCTGCA CCAACCGAG CATTAAGAC GTTATCATCC TGAATACAA CATTCAAT AGGACCGAAG ATGCTCAAC CTGGAGCCAG ATTCTCTCTG AAGNCACCGC
 L T W T N P S I K S V I I L K Y N I Q Y R T K D A S T W S Q I P E D T A

89p130 (D1-D3)_wt n° 771 ATCCACCGCA TCTTCATTTA CTCTCCAGA CCTTAACTT TTACAGAT ATCTGTTTAT GATTCTCTGT ATGAGGGAAG ATGCTAAGGG ATACTGAGT GACTGAGTG
 S T R S S F T V Q D L K P F T E Y V F R I R C M K E D G K G Y W S D W S E
 89p130 (D1-D3)_opt n° 771 GAGCACCGCT AGCAGCTTCA CCTTCAGGA TCTGAACCG TTACCGAT ATCTGTTTAT GATTCTCTGT ATGAGGGAAG ATGCTAAGGG CTACTGAGC GATTGAGCG
 S T R S S F T V Q D L K P F T E Y V F R I R C M K E D G K G Y W S D W S E

sgp130 (D1-D3)_wt	n° 881	AAAGAGCGAG TGGGATCCAC TATGAGATA GACCATGA
		E A S G I T Y E D R P
sgp130 (D1-D3)_opt	n° 881	AAAGAGCGAG CGGTATCCAC TATGAGATC GTCCGTGA
		E A S G I T Y E D R P

esp130fc_wt n° 1 ATGTTGACGT TGCAGACTTG GCTAGTGGAA GCGCTGGTTA TTCTCTGAC CAGTGAAGT ACAGGTGAC TTCTAGATCC ATGTGTTAT ATGATGCTG ATCTGCACTT TGTAGCACTT
 M L T L Q T M L V Q A L F I F L T T E S T G E L L D P C G Y I S P E S P V V Q L
 esp130fc_opt n°1 ATCTGACAC TGCAGACATG GCTGCTGGAG GCGCTGGTTA TCTTTCTGAC CAGCGAGTCT ACAGAGAGAC TCTCTGATCC TTGCGCTAT ATCTGCTGCTG ATCTCTCTGT GCTGCGAGTG
 M L T L Q T M L V Q A L F I F L T T E S T G E L L D P C G Y I S P E S P V V Q L
 esp130fc_wt n° 121 CATCTTAAT TCKTGCAGT TTCTGTGCTA AAGGAAAT GTATGGATTA TTTCATGTA ATGCTAAT ACATTTCTG GAAACAAAC CATTTACTA TTCTTAGGA GCAATTAAT
 H S N F T A V C V L K E K C M D Y F R V N A N Y I V N K T N H F T I P K E Q Y T
 esp130fc_opt n° 121 CATCTTAAT TCKTGCAGT TTCTGTGCTA AAGGAAAT GCTAGGCTA CTTCGACTG AAGCTCACT ACATGCTGTC GAAACCAAC CACTTCACA TCCCGAGGA GCAATTAAT
 H S N F T A V C V L K E K C M D Y F R V N A N Y I V N K T N H F T I P K E Q Y T
 esp130fc_wt n° 241 ATCAATACA GAAACAGATC CAGTGTGAC TTACAGATA TACTTCAT TACTTCATG CTGACTGCA ACATCTTAC ATTCGACAG CTTCAGACA ATGTTATG ATCAATATA
 I I N R T A S S V T F T D I A S L N I Q L T C N I L T F G Q L E Q N V Y G I T I
 esp130fc_opt n° 241 ATCAATACC GAAACAGTTC TTCTGTGAC TTACAGATA TCTCTGCT GATATGCTG CTGACTGCA ACATCTTAC CTTCGACAG CTTCAGACA ATGTTATG CACTCAATC
 I I N R T A S S V T F T D I A S L N I Q L T C N I L T F G Q L E Q N V Y G I T I
 esp130fc_wt n° 361 ATTTCGGCT TGCCTGACA AAACCTTAA ATTTCAGTT GATTTGAA CGAGGGAG AAATGAGT CTGAGTGGGA TGTGAGAGG GAAACACT TGCAGACAA CTTCAGTTTA
 I S G L P P E K P K N L S C I V N E G K K M R C E W D G G R E T H L E T N F T L
 esp130fc_opt n° 361 ATCTGTGCT TGCCTGACA GAAGCTTAA AGCTGTCTT GATTTGAA TGAAGGAG AAATGAGT CTGAGTGGGA TGTGAGAGG GAAACACT TGCAGACAA CTTCAGCTG
 I S G L P P E K P K N L S C I V N E G K K M R C E W D G G R E T H L E T N F T L

Fig. 3

```

esp130Fc_wt      n° 481  AATCTGAAAT GGGCAAGACA CAAGTTTGT GATTGGAAAG CAAGGCTAC CAGCCGACG TTATGATGCT TACTGTATAT TTCTGACACA TTAAAGCTG GGTACAGACA
                           K S E W A T H K F A D C K A K R D T P T S C T V D Y S T V Y F V N I E V W V E A
esp130Fc_opt     n° 481  AAGTCTGAGT GGGCAAGACA CAAGTTTGT GACTTCAGG CCAAGAGGA TACCTTACC TCTTGCAGG TCGACTACT CACCTGTAC TTCTGACACA TCGAGCTG GGTGAGGCT
                           K S S W A T H K F A D C K A K R D T P T S C T V D Y S T V Y F V N I E V W V E A
-----
esp130Fc_wt      n° 601  GAGATGCTCC TTGGCAAGGT TACATGAGAT CATATGAAAT TTGATCTGT ATATTAAGTG AAGCCGATC GGGCAAGTA TTATGATGCT ATGATCTAG AGGAAGCTG TATGATCTTA
                           E N A L G K V T S D H I N F D P V Y K V K P N P P H N L S V I N S E E L S S I L
esp130Fc_opt     n° 601  GAGATGCTC TTGGCAAGGT GACCTGTGAC CACATCAACT TCGACCCGT GTACAGAGTG AAGCTTAAC CTCCTGACA CCTGTGCTG ATCAACTG AGAGCTGCT CTCATCTCTG
                           E N A L G K V T S D H I N F D P V Y K V K P N P P H N L S V I N S E E L S S I L
-----
esp130Fc_wt      n° 721  AATTTGCAAT GGGCAAGCC AAGTATTAG AGTATTATTA TACTAAATA TACATTCOA TATAGACCA AGATGCTC AACTTGGAG CAGATTCTC CTGAGAGAC AGGATCGACC
                           K L T W T N P S I K S V I I L K Y N I Q Y R T K D A S T W S Q I P P E D T A S T
esp130Fc_opt     n° 721  AAGCTGAACT GGGCAAGCC TTGCAATGAG TCGTGATCA TCTTGAGTA CAGATTCOA TACAGACCA AGATGCTC TACTGTGCT CAGATCTCT CTGAGATAC CGCTTCGACC
                           K L T W T N P S I K S V I I L K Y N I Q Y R T K D A S T W S Q I P P E D T A S T
-----
esp130Fc_wt      n° 841  CGATCTTCAT TCACTGTCA AGACCTTAA CTTTTCAG AATATGTT TACGATTGCG TGTATGAGG AGATGCTTA GCGATCTGCG AGTACTGCA GTGAGAGAGC AAGTGGAGTC
                           R S S F T V Q D L K P F T E Y V P R I R C H K E D G K G Y W S D N S E E A S G I
esp130Fc_opt     n° 841  AGATTCAGCT TCGAGTCCA GGAAGTGAG CTTTTCAGG AGTACTGTT CAGATTCGCG TCGAGAGCG AGATTCGGA GGGCTATTGCG TCGACTGCT CTGAGAGAGC TTCTGGCATC
                           R S S F T V Q D L K P F T E Y V F R I R C H K E D G K G Y W S D N S E E A S G I
-----

```

sgp130Fc_wt n° 961 ACCTATGAAG ATAGACCATC TAAAGCAACA AGTTTCTGGT ATAAATATGA TCATCCCAT ACTAAGGCT ACGAAACTGT ACGACTGTG TCGAAGCAT TCGCTCTTT TGAAGCAAT
 TYEDRPSKAPSFMYKIDPSHTQGYRTVQLVMKTLPPF E A N
 sgp130Fc_opt n° 961 ACCTAGAGG ACAGACTTC TAAAGCCCT ACCTTCTGGT ACAGATGGA CCTTCTGAC ACCAGGCT ATAGAAAGT GAGCTGTG TCGAAGCC TCGCTCCAT GAGGCTAAT
 TYEDRPSKAPSFMYKIDPSHTQGYRTVQLVMKTLPPF E A N

sgp130Fc_wt n° 1081 GGAAATCT TCGATTATGA AGTGACTCTC ACAGATGGA AATGACATTT ACGAATATAC ACGATTATG CCAGAAACT GACAGTAAT CTCAGAAATG ATCGTATCT ACGAACCTA
 GKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNA TKLT VNL TND RYLA TL
 sgp130Fc_opt n° 1081 GCGAATCC TCGACTATGA GGTGACCCCTG ACCAGATGGA AATCTGACT GCGAATATAC ACCGTGAGC CTACCAAGCT GACCTGAGC CTGACCAAGC ATAGATACT GCGTACCCCTG
 GKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNA TKLT VNL TND RYLA TL

sgp130Fc_wt n° 1201 ACGATTAAGAA ATCTTCTTGG CAAATCGAT GCGAGTUTTT TAACTATCCC TCGCTGTGAC TTTCAGCTA CTCACCCGT AATGATCTT AAGCATTC CCAGATTA CATCTTTTG
 TVRNLVGKSDAAVLTITPACD FQATHPVM DLEKAFP KDNMLN
 sgp130Fc_opt n° 1201 ACCGTGAGAA ATCTGTGCG CAAGTGTGAT GCTGCTGTGC TGACATCCC TCGCTGTGAT TTTCAGCTA CCCACCCGT GATGATCTG AAGGCTTCC CCAGATTA CATCTGTG
 TVRNLVGKSDAAVLTITPACD FQATHPVM DLEKAFP KDNMLN

sgp130Fc_wt n° 1321 GTGGAATGGA CTACTCGAG GGAATCTGTA ACGAATATA TACTTGAGTG GTGTGTGTTA TCGATTAAG CACCTGTAT CACAGCTG CACAGAGAG ATGCTACCT GATCGGACC
 VEWTTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWOQEDGTVHRT
 sgp130Fc_opt n° 1321 GTGGAATGGA CACAGCTAG AGAGTCCGTG ACGAATAGA TCTGTGAGTG GTGCTGTG TGTGATAGG CCGCTTGAT CACAGATG CAGAGAGAG ATGCGACCT GATAGAAC
 VEWTTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWOQEDGTVHRT

esp130Fc_wt n°1441 TATTTAGAG GGAAGTACG AGAGAGGAA TCGTATTGA TAACGTTAC TCGATATAT GCTGATGAC CAGGAGGCC TGAATCCATA AAGGCTACC TTAAACAAGC TCCACCTTC
Y L R G N L A E S K C Y L I T V T P V Y A D G P G S P E S I K A Y L K Q A P P S

esp130Fc_opt n°1441 TACCTGAGAG GCAATCTGGC CGAGTCTAAG TGTATCTGA TCAACGTCGAC CCTGTCTAT GCTGATGAC CTGGCTCTCC TGAAGTATC AAGGCTACC TGAAGCGGC TCTCTCATCT
Y L R G N L A E S K C Y L I T V T P V Y A D G P G S P E S I K A Y L K Q A P P S

esp130Fc_wt n°1561 AAGGACCTA CTGTTGGGAC AAAAAAGTA GGGAAAAAG AGCTGTCTT AGAGTGGGAC CAAGTCTCTG TTGATGTTCA GANTGATTT ATCAGAAATT ATACTATATT TTATAGAAC
K G P T V R T K K V G K N E A V L E W D Q L P V D V Q N G F I R N Y T I F Y R T

esp130Fc_opt n°1561 AAGGACCTA CCTGAGGAC AAGAAAGTG GGGAAAGAG AGCTGTCTT GAGTGGGAT CAGCTGCTG TGAATGACA GAACGCTTC ATCCGAACT ACACCATTT CTACCGGAC
K G P T V R T K K V G K N E A V L E W D Q L P V D V Q N G F I R N Y T I F Y R T

esp130Fc_wt n°1681 ATCATTTGGA ATGAAACTGC TGTGAATGTG GATTCTGCC AAGAAAGTA TACATGTCC TCTTTGACTA GTGACACATT GTACATGTA CGAATGGAG CATACACAGA TGAAGTGGG
I I G N E T A V N V D S S H T E Y T L S S L T S D T L Y M V R M A A Y T D E G G

esp130Fc_opt n°1681 ATCATGGA ATGAGAGGC CTGAAAGTG GATTCTGCC ACACGAGTA CACACTGTCC TCTGTGACT CTGACACCT GTACATGTTG AGAATGGCG CTATATACGA TGAAGGCGC
I I G N E T A V N V D S S H T E Y T L S S L T S D T L Y M V R M A A Y T D E G G

esp130Fc_wt n°1801 AAGGATGTC CAGAAATCAG ATCTGTGAC AAAAACTACA CATGCCAC GTGCCAGCA CTGAAAGCG AGGCGCGCC GTGATGTTG CTCTTCCCC CAAGACCA GGAACCTTC
K D G P E F R S C D K T H T C P P C P A P E A E G A P S V F L F P P K P K D T L

esp130Fc_opt n°1801 AAGGATGAC CTGAGTTGAG ATCTGTGAC AAGACCAACA CCTGTCTCC TTGTCTGCT CTGAGGCTG AGGCGCTCC TTGTGTTT CTCTTCCCC CAAGACCTAA GGAATACCTG
K D G P E F R S C D K T H T C P P C P A P E A E G A P S V F L F P P K P K D T L

esp130Fc_wt n° 1921 ATGATCTGCC GACCCCTTCA GGTGACATTC GTGTGTGTGG AGGTGAGCCA CGAAGACCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA GTGGAGGGCC GTGGAGGTGC ATTAATGCCA GACAAAGGCC
 M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P
 esp130Fc_opt n° 1921 ATGATCTCCA GAACCCCTCA GGTGACATTC GTGTGTGTGG ATGTGTCTCA TGAAGACCCC GAGGTCAAGT TCAACTGGTA GTGGAGGTGC AGAATGTCTA GACCAAGCCT
 M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P
 esp130Fc_wt n° 2041 CGGGAGGAGC AGTACAAACAG CAGTACACCT GTGTGACGGC TCCTACACCT CCTGCACCG GACTGGCTGA ATGGCAAGCA GTACAGTGC AAGGTCTCCA ACAGAGCCTT CCGAGCCCCC
 R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P
 esp130Fc_opt n° 2041 AGGGAGGAGC AGTACAACTC CAGTACACCT GTGTGACGGC TCCTACACCT CCTGCACCG GACTGGCTGA ACAGCAAGCA GTACAGTGC AAGGTCTCCA ACAGAGCCTT CCGTGTCTCT
 R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P
 esp130Fc_wt n° 2161 ATCGAAGAAA CCAATCTCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCAAGGT GTACACCTG CCCCATGCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTGAGCC TGACCTGCTT GGTCAAGGCC
 I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G
 esp130Fc_opt n° 2161 ATCGAAGAAAG CCAATCTCAA AGCCAAAGGA CAGCCTTAGAG AGCCTTAGGT GTACACACTG CCTCCATCTA GGGAGGAGAT GACCAAGAAT CAGGTGTGCC TGACCTGTCT GGTCAAGGCC
 I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G
 esp130Fc_wt n° 2281 TTCTATCCCA GCGACATGCG GTTGGATGCG GAGAGCAATG GCGAGCCGGA GAACAACTAC AAGACACGCG CTCCTGTGCT GGAATCGGAC GGTCTCTTCT TCCTCTATAG CAAGTCAAC
 F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T
 esp130Fc_opt n° 2281 TTCTACCTTT CTGATATGCG TGTGATGCG GAGTCTAATG GCGAGCCGGA GAACAACTAC AAGACACGCG CTCCTGTGCT GGAATCTGAC GGTCTCTTCT TCCTCTACTC CAAGTCAAC
 F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T

sgp130Fc_wc n° 2401 GTGGACGAGA GGAGGTGGCA GCGGGGAC GTTCTTCAT GCTCGGTGAT GCATGAGGCT CTGCACACCC ACTACACCCA GAGGAGCTC TTCCTGTCTC CGGGTAATG A
 V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
 sgp130Fc_opt n° 2401 GTGCACAACT CTAGATGCA GCGGGCAAC GTTCTCTCT GTTCGGTAT GCACGAGGCT CTGCACAACT ACTATACCCA GAGTCCCTG TTCCTGTCTC CTGGCAATG A
 V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

Figura 4

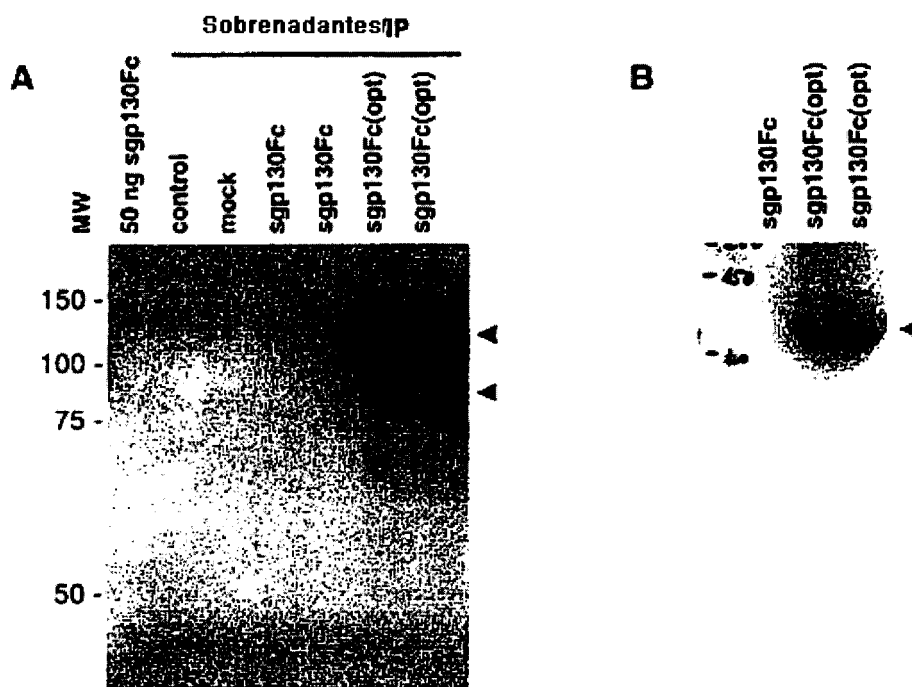


Figura 5

