



Unidad y Orden

REPÚBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PCT
PATENTE DE INVENCION

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

07-21336

TITULO: PROTEINAS DE FUSION RAGE Y METODOS DE USO

SOLICITANTE: TRANSTECH PHARMA, INC. Y TRUSTESS OF COLUMBIA
UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

DIRECCIÓN: 4170 Mendenhall Oaks Parkway, Suite 110, High Point, North
Carolina; West 115th Street & Broadway, New York, New York 10027.
Estados Unidos de América.

APODERADO: J. IAN RAISEB

BOGOTÁ, 2 DE MARZO, 2007

F. 11 (2-03-2007)

Publicación

Implementado 6 F. 1100 15-03-2007

Olart Raisbeck


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-021336-00000-0000
Fac: 2007-03-02 15:38:54 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tig. 11 PATENTEYII
Eva: 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folio 329

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: TRANSTECH PHARMA, INC Y THE
TRUSTESS OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE
CITY OF NEW YORK.

Dirección: 4170 Mendenhall Oaks Parkway, Suite 110,
High Point, North Carolina 27265; West 116th Street &
Broadway, New York, New York 10027

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América.

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: J. IAN RAISBECK

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.376.996 Btá
TP 135.799

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/027694 Fecha Agosto 3, 2005

Publicación Internacional No. WO 2006/017643 Fecha Febrero 16, 2006

6

Título (54): PROTEÍNAS DE FUSION RAGE Y METODOS DE USO

7

Clasificación Internacional (51) C12N 15/62; C07K 14/705; A61K 38/17

8

Prioridad

SI ☒ N ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Agosto 3, 2004

(31) Número de Solicitud

60/598.362

9

Comprobante de pago No. 07- 17.809

Fecha Marzo 1, 2007

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: J. JAN RAISBECK

FIRMA:

J. Jan Raisbeck

C.C. 79.376.996 Btá T.P. 135.799

LISTA DE INVENTORES PCT/US2005/027694

1. **ADNAN M.M. MJALLI**
6421 Ashton Park Drive,
Oak Ridge, North Carolina 27310
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense.
2. **DAVID M. STERN**
8460 Springvalley Road,
Cincinnati, Ohio 45236
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense.
3. **YE E. TIAN**
4600 Crowne Lake Circle, 1D,
Jamestown, North Carolina 27282.
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense.
4. **JEFFREY C. WEBSTER**
4807 Worchester Place,
Jamestown, North Carolina 27282.
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense.
5. **ROBERT ROTHLEIN**
6988 Saratoga Court,
Summerfield, North Carolina 27358.
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense.
6. **ANN MARIE SCHMIDT**
242 HAVEN Road,
Franklin Lakes, New Jersey 07417
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense.
7. **SHI DU YAN**
58 Hamilton Place,
Tenafly, New Jersey 07670
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense.

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 17,809
FECHA : MARZO 1 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-021338-00000-0000
Fec: 2007-03-02 16:56:54 Dep. 8020 NUECREACIONES
Trib. 11 PATENTE/VI
Env: 370 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folio: 329

***** CONSIGNACION *****

DEB. TAJE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	57477300	27/02/2007	1,389,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SOM: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

El documento de Poder adjunto de Transtech Pharma Inc. a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva una certificación notarial con el siguiente sello en inglés:

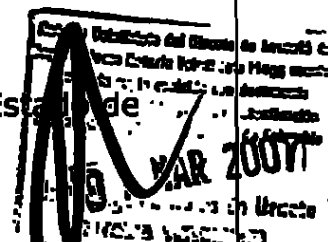
(Firmado) Vanessa McDade

Sello: "Notario Público de Carolina del Norte - Condado de Gullford.

Vanessa McDade. Mi comisión vence el 7/25/2007".

Apostilla adjunta:

Estado de Carolina de Norte Departamento del Secretario de Estado APOSTILLA: (Convention de La Haye du 5 octobre 1961) Estados Unidos de América	
1. País:	<u>El presente documento público</u>
2. Ha sido firmado por:	Vanessa McDade
3. Actuando en calidad de:	Notario Público. Comisión vence el 7/25/2007
4. Lleva el sello/estampilla de:	Condado de Gullford, Carolina del Norte <u>Certificado</u>
5. En:	Raleigh, Carolina de Norte
6. El:	31 de Enero de 2007
7. Por:	El Subsecretario de Estado. Estado de Carolina del Norte
8. Bajo el No.:	1906
9. Sello / estampilla:	El Estado de Carolina del Norte. Departamento de Estado
10. Firma:	Haley Haynes. Subsecretario de Estado Elaine Marshall. Secretario de Estado



[Handwritten signature]

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Transtech P. - Apost."

Fecha: 15 de Febrero de 2007.

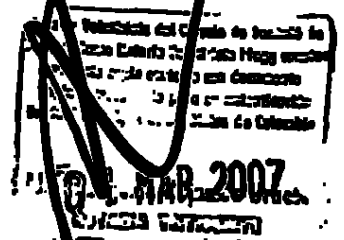
Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: tresejer1@yahoo.com. No. 9509



Traductor Oficial

JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 374 - 1993 Ministerio

STATE OF NORTH CAROLINA



Department of The
Secretary of State

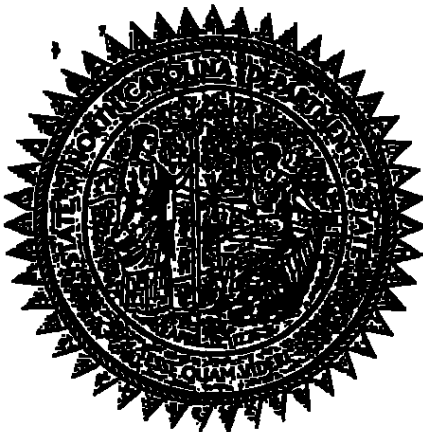
7

APOSTILLE (Convention de La Haye 5 octobre 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. This Public Document
has been signed by VANESSA MCDADE
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
COMMISSION EXPIRES 7/25/2007
4. bears the seal/stamp of COUNTY OF GUILFORD, NORTH CAROLINA

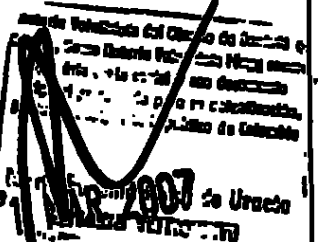
CERTIFIED

5. at Raleigh, North Carolina
6. the 31ST DAY OF JANUARY, 2007
7. by Secretary of State or Deputy Secretary of State, State of North Carolina
8. No. 1906
9. Seal/Stamp
10. Signature



By:

Haley Haynes
Haley Haynes
Deputy Secretary of State



Clairne J. Marshall

Secretary of State

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

TRANSTECH PHARMA, INC.

domiciled in

domiciliado en

4170 Mendenhall Oaks Parkways, Suite 110, High Point,
North Carolina 27265, United States of América.

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other Intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma: William V. Buccella x



Date/Fecha: January 9, 2007

City/Country/Ciudad,País: High Point, North Carolina, USA



9

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,
January 9, 2007

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

4170 Mendenhall Oaks Pkwy, High Point, NC 27265

signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as

of TRANSTECH PHARMA, INC..

3. That TRANSTECH PHARMA, INC., having its principal place of business located in High Point, North Carolina

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Minutes of the Meeting of the Board of Directors held December 1, 1998, Amended Bylaws, executed August 27, 1999 and the Minutes of the Meeting of the Board of Directors held January 23, 2003 where William V. Buccella was elected Senior Vice President of Legal Affairs and Secretary, executed January 23, 2003

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

William V. Buccella

mayor de edad y domiciliado

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

de

4. Que

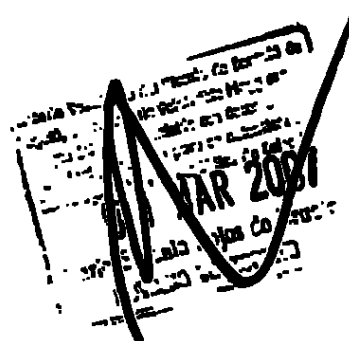
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature): Vanessa McDade
My Commission Expires: July 25, 2007



10

**ESTADO DE CAROLINA DEL NORTE
DEPARTMENT OF THE SECRETARY OF STATE**

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR: VANESSA MCDADE
3. EN CALIDAD DE: NOTARIO PÚBLICO CUYA COMISION VENCE EL 7/25/2007.
4. LLEVA EL SELLO DE: NOTARIO PÚBLICO DEL ESTADO DE CAROLINA DEL NORTE,

CERTIFICÓ

5. EN RALEIGH, CAROLINA DEL NORTE
6. EL 31 DE ENERO DE 2007
7. POR: EL DELEGADO DE LA SECRETARIA DEL ESTADO DE CAROLINA DEL NORTE
8. No. 1905
9. SELLO: POR EL SECRETARIO DE ESTADO O SECRETARIO DIPUTADO DE ESTADO, ESTADO DE CAROLINA DEL NORTE
10. FIRMA: Harley Haynes (Secretario Diputado de Estado)
Secretario de Estado

CESION

11
14

Adnan M.M. Mjalli, Ye E. Tian, Jeffrey C. Webster y Robert Rothlein

Por medio de la presente y a cambio del pago de una contraprestación económica cedemos a

TRANSTECH PHARMA, INC.

Una sociedad organizada bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América,

Domiciliada en 4170 Mendenhall Oaks Parkway Suite 110, High Point Carolina del Norte 27265, Estados Unidos de América.

(De ahora en adelante el "Cesionario"), todos nuestros derechos, título e interés sobre nuestra invención col como se describe en:

**PROTEINAS PARA LA FUSION DE LA RABIA Y SUS METODOS DE USO
(PCT/US2005/027694)**

En lo que concierne a la República de Colombia

High Point, NC

Lugar y fecha: 23 de enero de 2007

Transtech Pharma, Inc

Firma del cedente: (Fdo) ADNAN MM MJALLI

En lo que concierne a la República de Colombia

High Point, NC

Lugar y fecha: 23 de enero de 2007

Transtech Pharma, Inc

Firma del cedente: (Fdo) YE E. TIAN

En lo que concierne a la República de Colombia

High Point, NC

Lugar y fecha: 23 de enero de 2007

Transtech Pharma, Inc

Firma del cedente: (Fdo) JEFFREY C. WEBSTER

En lo que concierne a la República de Colombia

High Point, NC

Lugar y fecha: 23 de enero de 2007

Transtech Pharma, Inc

Firma del cedente: (Fdo) ROBERT ROTHLEIN

12

Carolina del Norte
Condado de Guilford

13

Certifico que las personas a continuación comparecieron personalmente ante mi en esta fecha, cada quien reconocido ante mi ser quien firma el documento precedente. Adnan M. M. Mjalli

Fecha: 23 de enero de 2007
(sello Oficial)

(firmado: Vanessa McDade)
Notario Público,
VANESSA MCDADE
Notario Público, Carolina del Norte
Condado de Guilford
Mi comisión vence el 25 de julio de 2007

Carolina del Norte
Condado de Guilford

Certifico que las personas a continuación comparecieron personalmente ante mi en esta fecha, cada quien reconocido ante mi ser quien firma el documento precedente Ye E. Tian

Fecha: 23 de enero de 2007
(sello Oficial)

(firmado: Vanessa McDade)
Notario Público,
VANESSA MCDADE
Notario Público, Carolina del Norte
Condado de Guilford
Mi comisión vence el 25 de julio de 2007

Carolina del Norte
Condado de Guilford

Certifico que las personas a continuación comparecieron personalmente ante mi en esta fecha, cada quien reconocido ante mi ser quien firma el documento precedente. Jeffrey C. Webster

Fecha: 23 de enero de 2007
(sello Oficial)

(firmado: Vanessa McDade)
Notario Público,

VANESSA MCDADE
Notario Público, Carolina del Norte
Condado de Guilford
Mi comisión vence el 25 de julio de 2007

Carolina del Norte
Condado de Guilford

Certifico que las personas a continuación comparecieron personalmente ante mi en esta fecha, cada quien reconocido ante mi ser quien firma el documento precedente. Robert Rothlein

Fecha: 23 de enero de 2007
(sello Oficial)

(firmado: Vanessa McDade)
Notario Público,
VANESSA MCDADE
Notario Público, Carolina del Norte
Condado de Guilford
Mi comisión vence el 25 de julio de 2007

Carolina del Norte
Condado de Guilford

Yo, Vanessa McDade Notario Público del condado Guilford, Carolina del Norte certifico que Stephen Holcombe personalmente vino ante mí en esta fecha y reconoció que es el Funcionario Director Financiero de Transtech Pharma, Inc., una sociedad, y que él como Vicepresidente Principal, siendo autorizado para hacerlo, ejecutó el precedente poder de abogado en representación de esta sociedad.

Firmado con mi mano y sello oficial el 23 de enero de 2007.

(sello Oficial)

(firmado: Vanessa McDade)
Notario Público,
VANESA MCDADE
Notario Público, Carolina del Norte
Condado de Guilford
Mi comisión vence el 25 de julio de 2007

STATE OF NORTH CAROLINA



16
Department of The
Secretary of State

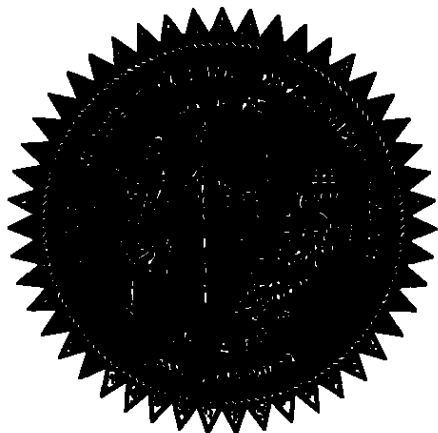
APOSTILLE

(Convention de La Haye 5 octobre 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. This Public Document
has been signed by VANESSA MCDADE
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
COMMISSION EXPIRES 7/25/2007
4. bears the seal/stamp of COUNTY OF GUILFORD, NORTH CAROLINA

CERTIFIED

5. at Raleigh, North Carolina
6. the 31ST DAY OF JANUARY, 2007
7. by Secretary of State or Deputy Secretary of State, State of North Carolina
8. No. 1905
9. Seal/Stamp
10. Signature



By:

Haley Haynes
Haley Haynes
Deputy Secretary of State

Claine J. Marshall

Secretary of State

ASSIGNMENT

CESION

Adnan M.M. Mjalli, Ye E. Tian, Jeffrey C. Webster and Robert Rothlein

by means of this document and in consideration
of the payment by the Assignee to the Assignor
of a good and valuable consideration, assign(s)
to

por medio de la presente y a cambio del pago de
una contraprestación económica, cedo (cedemos)
a

TRANSTECH PHARMA, INC.

A Corporation
organized under the laws of

una
organizada bajo las leyes de

State of Delaware, USA

Domiciled in

domiciliada en

4170 Mendenhall Oaks Parkway, Suite 110, High Point, North Carolina 27265 USA

(hereinafter referred to as the "ASSIGNEE"),
and be it
all my (our) rights, title and interest in and to my
(our) invention for a new and useful
improvement entitled and as fully set forth and
described in:

(de ahora en adelante el "CESIONARIO"),
todos mis (nuestros) derechos, título e interés
sobre mi (nuestra) invención tal como describe
en:

RAGE FUSION PROTEINS AND METHODS OF USE (PCT/US2005/027694)

So far as the Republic of Colombia is concerned.

en lo que concierne a la República de Colombia.

High Point, NC
Place, date January 23, 2007
TransTech Pharma, Inc.
Assignor(s) (Signature) _____

Adnan M.M. Mjalli

Assignee(s) (Signature) _____

Lugar, fecha

Cedente(s) (Firma)

Cesionario(s) (Firma)

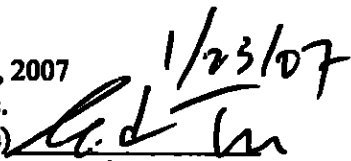
So far as the Republic of Colombia is concerned.

en lo que concierne a la República de Colombia.

High Point, NC

Place, date January 23, 2007

TransTech Pharma, Inc.

Assignor(s) (Signature) 

Ye E. Tian

Assignee(s) (Signature) 

So far as the Republic of Colombia is concerned.

Lugar, fecha

Cedente(s) (Firma)

Cesionario(s) (Firma)

en lo que concierne a la República de Colombia.

High Point, NC

Place, date January 23, 2007

TransTech Pharma, Inc.

Assignor(s) (Signature) 

Jeffrey C. Webster

Assignee(s) (Signature) 

So far as the Republic of Colombia is concerned.

Lugar, fecha

Cedente(s) (Firma)

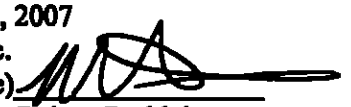
Cesionario(s) (Firma)

en lo que concierne a la República de Colombia.

High Point, NC

Place, date January 23, 2007

TransTech Pharma, Inc.

Assignor(s) (Signature) 

Robert Rothlein

Assignee(s) (Signature) 

So far as the Republic of Colombia is concerned.

Lugar, fecha

Cedente(s) (Firma)

Cesionario(s) (Firma)

en lo que concierne a la República de Colombia.

19

North Carolina
Guilford County

I certify that the following person personally appeared before me this day, each acknowledging to me that he signed the foregoing document: **Adnan M. M. Mjalli.**

Date: 1/23/07

Vanessa McDade
Notary Public



Printed Name: Vanessa McDade

My Commission Expires: July 25, 2007

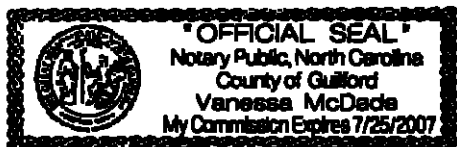
North Carolina
Guilford County

I certify that the following person personally appeared before me this day, each acknowledging to me that he signed the foregoing document: **Ye E. Tian.**

Date: 1/23/07

Vanessa McDade
Notary Public

(SEAL)



Printed Name: Vanessa McDade

My Commission Expires: July 25, 2007

20

North Carolina
Guilford County

I certify that the following person personally appeared before me this day, each acknowledging to me that he signed the foregoing document: **Jeffrey C. Webster.**

Date: 1/23/07

Vanessa McDade
Notary Public

(SEAL)

Printed Name: Vanessa McDade

My Commission Expires: July 25, 2007



North Carolina
Guilford County

I certify that the following person personally appeared before me this day, each acknowledging to me that he signed the foregoing document: **Robert Rothlein.**

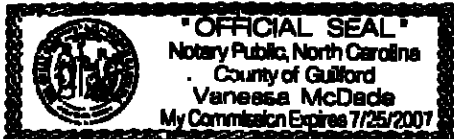
Date: 1/23/07

Vanessa McDade
Notary Public

(SEAL)

Printed Name: Vanessa McDade

My Commission Expires: July 25, 2007



21

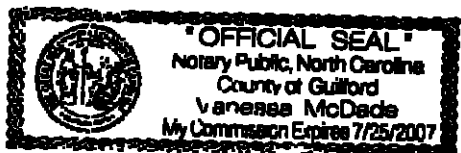
North Carolina

Guilford County

I, Vanessa McDade a Notary Public for Guilford County, North Carolina, certify that Stephen Holcombe personally came before me this day and acknowledged that he is Chief Financial Officer of TransTech Pharma, Inc., a corporation, and that he, as Senior Vice President being authorized to do so, executed the foregoing Power of Attorney on behalf of the corporation.

Witness my hand and official seal, this the 23rd day of January, 2007.

(SEAL)



Vanessa M. McDade
Notary Public

Print Name: Vanessa McDade
My Commission Expires: July 25, 2007

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



22

(43) International Publication Date
16 February 2006 (16.02.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/017643 A1

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/62, C07K 14/705, A61K 38/17

(21) International Application Number:
PCT/US2005/027694

(22) International Filing Date: 3 August 2005 (03.08.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/598,362 3 August 2004 (03.08.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
TRANSTECH PHARMA, INC. [US/US]; 4170 Mendenhall Oaks Parkway, Suite 110, High Point, NC 27265 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MJALLI, Adnan, M.M. [US/US]; 2902 Ellington Ct., Jamestown, NC 27282 (US). STERN, David, M. [US/US]; One 7th Street, Augusta, GA 30901 (US). TIAN, Ye, E. [US/US]; 4600 Crowne Lake Circle, 1D, Jamestown, NC 27282 (US). WEBSTER, Jeffrey, C. [US/US]; 4807 Worcester Place, Jamestown, NC 27282 (US). ROTHLEIN, Robert [US/US]; 6988 Saratoga Ct., Summerfield, NC 27358 (US).

(74) Agent: CALKINS, Charles, W.; Kilpatrick Stockton, LLP, 1001 West Fourth Street, Winston-Salem, NC 27101 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: RAGE FUSION PROTEINS AND METHODS OF USE

(57) Abstract: Disclosed are RAGE fusion proteins comprising RAGE polypeptide sequences linked to a second, non-RAGE polypeptide. The RAGE fusion protein may utilize a RAGE polypeptide domain comprising a RAGE ligand binding site and an interdomain linker directly linked to an immunoglobulin CH2 domain. Such fusion proteins may provide specific, high affinity binding to RAGE ligands. Also disclosed is the use of the RAGE fusion proteins as therapeutics for RAGE-mediated pathologies.

WO 2006/017643 A1

RAGE FUSION PROTEINS AND METHODS OF USE

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

5 The present application claims priority under 35 USC 119(e) from U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/598,362, filed August 3, 2004. The disclosure of U.S. Provisional Patent Application 60/598,362 is hereby incorporated by reference in its entirety herein.

FIELD OF THE INVENTION

10 The present invention relates to regulation of the Receptor for Advanced Glycated Endproducts (RAGE). More particularly, the present invention describes fusion proteins comprising a RAGE polypeptide, methods of making such fusion proteins, and the use of such proteins for treatment of RAGE-based disorders.

BACKGROUND

15 Incubation of proteins or lipids with aldose sugars results in nonenzymatic glycation and oxidation of amino groups on proteins to form Amadori adducts. Over time, the adducts undergo additional rearrangements, dehydrations, and cross-linking with other proteins to form complexes known as Advanced Glycosylation End Products (AGEs). Factors which promote formation of AGEs include delayed protein turnover (e.g. as in amyloidoses),
20 accumulation of macromolecules having high lysine content, and high blood glucose levels (e.g. as in diabetes) (Hori *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 25752-761, (1995)). AGEs have been implicated in a variety of disorders including complications associated with diabetes and normal aging.

 AGEs display specific and saturable binding to cell surface receptors on monocytes,
25 macrophages, endothelial cells of the microvasculature, smooth muscle cells, mesengial cells, and neurons. The Receptor for Advanced Glycated Endproducts (RAGE) is a member of the immunoglobulin supergene family of molecules. The extracellular (N-terminal) domain of RAGE includes three immunoglobulin-type regions: one V (variable) type domain followed by two C-type (constant) domains (Neeper *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:14998-15004 (1992);
30 Schmidt *et al.*, *Circ. (Suppl.)* 96#194 (1997)). A single transmembrane spanning domain and a short, highly charged cytosolic tail follow the extracellular domain. The N-terminal, extracellular domain can be isolated by proteolysis of RAGE or by molecular biological approaches to generate soluble RAGE (sRAGE) comprised of the V and C domains.

RAGE is expressed on multiple cell types including leukocytes, neurons, microglial cells and vascular endothelium (e.g., Hori *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:25752-761 (1995)). Increased levels of RAGE are also found in aging tissues (Schleicher *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 99 (3): 457-468 (1997)), and the diabetic retina, vasculature and kidney (Schmidt *et al.*,
 5 *Nature Med.*, 1:1002-1004 (1995)).

In addition to AGEs, other compounds can bind to and modulate RAGE. RAGE binds to multiple functionally and structurally diverse ligands including amyloid beta (A β), serum amyloid A (SAA), Advanced Glycation End products (AGEs), S100 (a proinflammatory member of the Calgranulin family), carboxymethyl lysine (CML),
 10 amphoterin and CD11b/CD18 (Bucciarelli *et al.*, *Cell Mol. Life Sci.*, 59:1117-128 (2002); Chavakis *et al.*, *Microbes Infect.*, 6:1219-1225 (2004); Kokkola *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, 61:1-9 (2005); Schmidt *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 108:949-955 (2001); Rocken *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 162:1213-1220 (2003)).

Binding of ligands such as AGEs, S100/calgranulin, β -amyloid, CML (N^c-
 15 Carboxymethyl lysine), and amphoterin to RAGE has been shown to modify expression of a variety of genes. These interactions may then initiate signal transduction mechanisms including p38 activation, p21ras, MAP kinases, Erk1-2 phosphorylation, and the activation of the transcriptional mediator of inflammatory signaling, NF- κ B (Yeh *et al.*, *Diabetes*, 50:1495-1504 (2001)). For example, in many cell types, interaction between RAGE and its
 20 ligands can generate oxidative stress, which thereby results in activation of the free radical sensitive transcription factor NF- κ B, and the activation of NF- κ B regulated genes, such as the cytokines IL-1 β and TNF- α . Furthermore, RAGE expression is upregulated via NF- κ B and shows increased expression at sites of inflammation or oxidative stress (Tanaka *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275:25781-25790 (2000)). Thus, an ascending and often detrimental spiral may be
 25 fueled by a positive feedback loop initiated by ligand binding.

Activation of RAGE in different tissues and organs can lead to a number of pathophysiological consequences. RAGE has been implicated in a variety of conditions including: acute and chronic inflammation (Hofmann *et al.*, *Cell* 97:889-901 (1999)), the development of diabetic late complications such as increased vascular permeability (Wautier
 30 *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 97:238-243 (1995)), nephropathy (Teillet *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11:1488-1497 (2000)), arteriosclerosis (Vlassara *et al.*, *The Finnish Medical Society DUODECIM, Ann. Med.*, 28:419-426 (1996)), and retinopathy (Hammes *et al.*, *Diabetologia*, 42:603-607 (1999)). RAGE has also been implicated in Alzheimer's disease (Yan *et al.*,

Nature, 382:685-691 (1996)), and in tumor invasion and metastasis (Taguchi *et al.*, *Nature*, 405:354-357 (2000)).

25

Despite the broad expression of RAGE and its apparent pleiotropic role in multiple diverse disease models, RAGE does not appear to be essential to normal development. For example, RAGE knockout mice are without an overt abnormal phenotype, suggesting that while RAGE can play a role in disease pathology when stimulated chronically, inhibition of RAGE does not appear to contribute to any unwanted acute phenotype (Liliensiek *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 113:1641-50 (2004)).

Antagonizing binding of physiological ligands to RAGE may down-regulate the pathophysiological changes brought about by excessive concentrations of AGEs and other RAGE ligands. By reducing binding of endogenous ligands to RAGE, symptoms associated with RAGE-mediated disorders may be reduced. Soluble RAGE (sRAGE) is able to effectively antagonize the binding of RAGE ligands to RAGE. However, sRAGE can have a half-life when administered *in vivo* that may be too short to be therapeutically useful for one or more disorders. Thus, there is a need to develop compounds that antagonize the binding of AGEs and other physiological ligands to the RAGE receptor where the compound has a desirable pharmacokinetic profile.

SUMMARY

Embodiments of the present invention comprise RAGE fusion proteins and methods of using such proteins. The present invention may be embodied in a variety of ways. Embodiments of the present invention may comprise a fusion protein comprising a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide. In one embodiment, the fusion protein comprises a RAGE ligand binding site. The fusion protein may further comprise a RAGE polypeptide directly linked to a polypeptide comprising C_H2 domain of an immunoglobulin, or a portion of the C_H2 domain.

The present invention also comprises a method to make a RAGE fusion protein. In one embodiment the method comprises linking a RAGE polypeptide to a second, non-RAGE polypeptide. In one embodiment, the RAGE polypeptide comprises a RAGE ligand binding site. The method may comprise linking a RAGE polypeptide directly to a polypeptide comprising the C_H2 domain of an immunoglobulin or a portion of the C_H2 domain.

In other embodiments, the present invention may comprise methods and compositions for treating a RAGE-mediated disorder in a subject. The method may comprise administering a fusion protein of the present invention to the subject. The composition may

comprise a RAGE fusion protein of the present invention in a pharmaceutically acceptable carrier.

26

There are various advantages that may be associated with particular embodiments of the present invention. In one embodiment, the fusion proteins of the present invention may be metabolically stable when administered to a subject. Also, the fusion proteins of the present invention may exhibit high-affinity binding for RAGE ligands. In certain embodiments, the fusion proteins of the present invention bind to RAGE ligands with affinities in the high nanomolar to low micromolar range. By binding with high affinity to physiological RAGE ligands, the fusion proteins of the present invention may be used to inhibit binding of endogenous ligands to RAGE, thereby providing a means to ameliorate RAGE-mediated diseases.

Also, the fusion proteins of the present invention may be provided in protein or nucleic acid form. In one example embodiment, the fusion protein may be administered systemically and remain in the vasculature to potentially treat vascular diseases mediated in part by RAGE. In another example embodiment, the fusion protein may be administered locally to treat diseases where RAGE ligands contribute to the pathology of the disease. Alternatively, a nucleic acid construct encoding the fusion protein may be delivered to a site by the use of an appropriate carrier such as a virus or naked DNA where transient local expression may locally inhibit the interaction between RAGE ligands and receptors. Thus, administration may be transient (*e.g.*, as where the fusion protein is administered) or more permanent in nature (*e.g.*, as where the fusion protein is administered as a recombinant DNA).

There are additional features of the invention which will be described hereinafter. It is to be understood that the invention is not limited in its application to the details set forth in the following claims, description and figures. The invention is capable of other embodiments and of being practiced or carried out in various ways.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Various features, aspects and advantages of the present invention will become more apparent with reference to the following figures.

FIG. 1 shows various RAGE sequences in accordance with alternate embodiments of the present invention: Panel A, SEQ ID NO: 1, the amino acid sequence for human RAGE; and SEQ ID NO: 2, the amino acid sequence for human RAGE without the signal sequence of amino acids 1-22; Panel B, SEQ ID NO: 3, the amino acid sequence for human RAGE without the signal sequence of amino acids 1-23; Panel C, SEQ ID NO: 4, the amino acid

27

sequence of human sRAGE; SEQ ID NO: 5, the amino acid sequence of human sRAGE without the signal sequence of amino acids 1-22, and SEQ ID NO: 6, the amino acid sequence of human sRAGE without the signal sequence of amino acids 1-23; Panel D, SEQ ID NO: 7, an amino acid sequence comprising the V-domain of human RAGE; SEQ ID NO: 8, an alternate amino acid sequence comprising the V-domain of human RAGE; SEQ ID NO: 9, an N-terminal fragment of the V-domain of human RAGE; SEQ ID NO: 10, an alternate N-terminal fragment of the V-domain of human RAGE; SEQ ID NO: 11, the amino acid sequence for amino acids 124-221 of human RAGE; SEQ ID NO: 12, the amino acid sequence for amino acids 227-317 of human RAGE; SEQ ID NO: 13, the amino acid sequence for amino acids 23-123 of human RAGE; Panel E, SEQ ID NO: 14, the amino acid sequence for amino acids 24-123 of human RAGE; SEQ ID NO: 15, the amino acid sequence for amino acids 23-136 of human RAGE; SEQ ID NO: 16, the amino acid sequence for amino acids 24-136 of human RAGE; SEQ ID NO: 17, the amino acid sequence for amino acids 23-226 of human RAGE; SEQ ID NO: 18, the amino acid sequence for amino acids 24-226 of human RAGE; Panel F, SEQ ID NO: 19, the amino acid sequence for amino acids 23-251 of human RAGE; SEQ ID NO: 20, the amino acid sequence for amino acids 24-251 of human RAGE; SEQ ID NO: 21, a RAGE interdomain linker; SEQ ID NO: 22, a second RAGE interdomain linker; SEQ ID NO: 23, a third RAGE interdomain linker; SEQ ID NO: 24, a fourth RAGE interdomain linker; Panel G, SEQ ID NO: 25, DNA encoding human RAGE amino acids 1-118; SEQ ID NO: 26, DNA encoding human RAGE amino acids 1-123; and SEQ ID NO: 27, DNA encoding human RAGE amino acids 1-136; Panel H, SEQ ID NO: 28, DNA encoding human RAGE amino acids 1-230; and SEQ ID NO: 29, DNA encoding human RAGE amino acids 1-251; Panel I, SEQ ID NO: 38, a partial amino acid sequence for the C_H2 and C_H3 domains of human IgG; SEQ ID NO: 39, DNA encoding a portion of the human C_H2 and C_H3 domains of human IgG; SEQ ID NO: 40, an amino acid sequence for the C_H2 and C_H3 domains of human IgG; Panel J, SEQ ID NO: 41, a DNA encoding the human C_H2 and C_H3 domains of human IgG; SEQ ID NO: 42, an amino acid sequence for the C_H2 domain of human IgG; SEQ ID NO: 43, an amino acid sequence for the C_H3 domain of human IgG; and SEQ ID NO: 44, a fifth RAGE interdomain linker.

FIG. 2 shows the DNA sequence (SEQ ID NO: 30) of a RAGE fusion protein (TTP-4000) coding region in accordance with an embodiment of the present invention. Coding sequence 1-753 highlighted in bold encodes RAGE N-terminal protein sequence whereas sequence 754-1386 encodes human IgG Fc (γ 1) protein sequence.

FIG. 3 shows the DNA sequence (SEQ ID NO: 31) of an alternate RAGE fusion protein (TTP-3000) coding region in accordance with an embodiment of the present invention. Coding sequence 1-408 highlighted in bold encodes RAGE N-terminal protein sequence, whereas sequence 409-1041 codes human IgG Fc ($\gamma 1$) protein sequence.

28

FIG. 4 shows the amino acid sequences, SEQ ID NO: 32 (TTP-4000), SEQ ID NO: 33, and SEQ ID NO: 34, that each encode a four domain RAGE fusion protein in accordance with alternate embodiments of the present invention. RAGE sequence is highlighted with bold font.

FIG. 5 shows the amino acid sequences, SEQ ID NO: 35 (TTP-3000), SEQ ID NO: 36, and SEQ ID NO: 37, that each encode a three domain RAGE fusion protein in accordance with alternate embodiments of the present invention. RAGE sequence is highlighted with bold font.

FIG. 6, Panel A, shows a comparison of the protein domains in human RAGE and human Ig gamma-1 Fc protein, and cleavage points used to make TTP-3000 (at position 136) and TTP-4000 (at position 251) in accordance with alternate embodiments of the present invention; and Panel B shows the domain structure for TTP-3000 and TTP-4000 in accordance with alternate embodiments of the present invention.

FIG. 7 shows results of an *in vitro* binding assay for sRAGE, and RAGE fusion proteins TTP-4000 (TT4) and TTP-3000 (TT3), to the RAGE ligands amyloid-beta (A-beta), S100b (S100), and amphoterin (Ampho), in accordance with an embodiment of the present invention.

FIG. 8 shows results of an *in vitro* binding assay for RAGE fusion protein TTP-4000 (TT4) ("Protein") to amyloid-beta as compared to a negative control only including the immunodetection reagents ("Complex Alone"), and antagonism of such binding by a RAGE antagonist ("RAGE Ligand") in accordance with an embodiment of the present invention.

FIG. 9 shows results of an *in vitro* binding assay for RAGE fusion protein TTP-3000 (TT3) ("Protein") to amyloid-beta as compared to a negative control only including the immunodetection reagents ("Complex Alone"), and antagonism of such binding by a RAGE antagonist ("RAGE Ligand") in accordance with an embodiment of the present invention.

FIG. 10 shows results of a cell-based assay measuring the inhibition of S100b-RAGE induced production of TNF- α by RAGE fusion proteins TTP-3000 (TT3) and TTP-4000 (TT4), and sRAGE in accordance with an embodiment of the present invention.

FIG. 11 shows a pharmacokinetic profile for RAGE fusion protein TTP-4000 in accordance with an embodiment of the present invention wherein each curve represents a different animal under the same experimental conditions.

29

FIG. 12 shows relative levels of TNF- α release from THP-1 cells due to stimulation by RAGE fusion protein TTP-4000 and human IgG stimulation as a measure of an inflammatory response in accordance with an embodiment of the present invention

FIG. 13 shows the use of RAGE fusion protein TTP-4000 to reduce restenosis in diabetic animals in accordance with alternate embodiments of the present invention, wherein panel A shows that TTP-4000 RAGE-fusion protein reduced the intima/media ratio as compared to a negative control (IgG), and panel B shows that TTP-4000 RAGE-fusion protein reduced vascular smooth muscle cell proliferation in a dose-responsive manner.

FIG. 14 shows use of RAGE fusion protein TTP-4000 to reduce amyloid formation and cognitive dysfunction in animals with Alzheimer's Disease (AD) in accordance with alternate embodiments of the present invention wherein panel A shows TTP-4000 RAGE-fusion protein reduced amyloid load in the brain, and panel B shows TTP-4000 RAGE-fusion protein improved cognitive function.

FIG. 15 shows saturation-binding curves with TTP-4000 to various immobilized known RAGE ligands in accordance with an embodiment of the present invention.

DETAILED DESCRIPTION

For the purposes of this specification, unless otherwise indicated, all numbers expressing quantities of ingredients, reaction conditions, and so forth used in the specification are to be understood as being modified in all instances by the term "about." Accordingly, unless indicated to the contrary, the numerical parameters set forth in the following specification are approximations that can vary depending upon the desired properties sought to be obtained by the present invention. At the very least, and not as an attempt to limit the application of the doctrine of equivalents to the scope of the claims, each numerical parameter should at least be construed in light of the number of reported significant digits and by applying ordinary rounding techniques.

Notwithstanding that the numerical ranges and parameters setting forth the broad scope of the invention are approximations, the numerical values set forth in the specific examples are reported as precisely as possible. Any numerical value, however, inherently contains certain errors necessarily resulting from the standard deviation found in their respective testing measurements. Moreover, all ranges disclosed herein are to be understood to encompass any and all subranges subsumed therein. For example, a stated range of "1 to

35

10" should be considered to include any and all subranges between (and inclusive of) the minimum value of 1 and the maximum value of 10; that is, all subranges beginning with a minimum value of 1 or more, e.g. 1 to 6.1, and ending with a maximum value of 10 or less, e.g., 5.5 to 10. Additionally, any reference referred to as being "incorporated herein" is to be understood as being incorporated in its entirety.

It is further noted that, as used in this specification, the singular forms "a," "an," and "the" include plural referents unless expressly and unequivocally limited to one referent. The term "or" is used interchangeably with the term "and/or" unless the context clearly indicates otherwise.

Also, the terms "portion" and "fragment" are used interchangeably to refer to parts of a polypeptide, nucleic acid, or other molecular construct.

As used herein, the term "upstream" refers to a residue that is N-terminal to a second residue where the molecule is a protein, or 5' to a second residue where the molecule is a nucleic acid. Also as used herein, the term "downstream" refers to a residue that is C-terminal to a second residue where the molecule is a protein, or 3' to a second residue where the molecule is a nucleic acid.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art. Practitioners are particularly directed to Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel) for definitions and terms of the art. Abbreviations for amino acid residues are the standard 3-letter and/or 1-letter codes used in the art to refer to one of the 20 common L-amino acids.

A "nucleic acid" is a polynucleotide such as deoxyribonucleic acid (DNA) or ribonucleic acid (RNA). The term is used to include single-stranded nucleic acids, double-stranded nucleic acids, and RNA and DNA made from nucleotide or nucleoside analogues.

The term "vector" refers to a nucleic acid molecule that may be used to transport a second nucleic acid molecule into a cell. In one embodiment, the vector allows for replication of DNA sequences inserted into the vector. The vector may comprise a promoter to enhance expression of the nucleic acid molecule in at least some host cells. Vectors may replicate autonomously (extrachromosomal) or may be integrated into a host cell chromosome. In one embodiment, the vector may comprise an expression vector capable of producing a protein derived from at least part of a nucleic acid sequence inserted into the vector.

As is known in the art, conditions for hybridizing nucleic acid sequences to each other can be described as ranging from low to high stringency. Generally, highly stringent

31
hybridization conditions refer to washing hybrids in low salt buffer at high temperatures. Hybridization may be to filter bound DNA using hybridization solutions standard in the art such as 0.5M NaHPO₄, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), at 65°C, and washing in 0.25 M NaHPO₄, 3.5% SDS followed by washing 0.1 x SSC/0.1% SDS at a temperature ranging
5 from room temperature to 68°C depending on the length of the probe (*see e.g.* Ausubel, F.M. *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Ed., Chapter 2, John Wiley & Sons, N.Y). For example, a high stringency wash comprises washing in 6x SSC/0.05% sodium pyrophosphate at 37°C for a 14 base oligonucleotide probe, or at 48°C for a 17 base oligonucleotide probe, or at 55°C for a 20 base oligonucleotide probe, or at 60°C for a 25
10 base oligonucleotide probe, or at 65°C for a nucleotide probe about 250 nucleotides in length. Nucleic acid probes may be labeled with radionucleotides by end-labeling with, for example, [γ -³²P]ATP, or incorporation of radiolabeled nucleotides such as [α -³²P]dCTP by random primer labeling. Alternatively, probes may be labeled by incorporation of biotinylated or fluorescein labeled nucleotides, and the probe detected using Streptavidin or anti-fluorescein
5 antibodies.

As used herein, "small organic molecules" are molecules of molecular weight less than 2,000 Daltons that contain at least one carbon atom.

"Polypeptide" and "protein" are used interchangeably herein to describe protein molecules that may comprise either partial or full-length proteins.

20 The term "fusion protein" refers to a protein or polypeptide that has an amino acid sequence derived from two or more proteins. The fusion protein may also include linking regions of amino acids between amino acid portions derived from separate proteins.

As used herein, a "non-RAGE polypeptide" is any polypeptide that is not derived from RAGE or a fragment thereof. Such non-RAGE polypeptides include immunoglobulin
25 peptides, dimerizing polypeptides, stabilizing polypeptides, amphiphilic peptides, or polypeptides comprising amino acid sequences that provide "tags" for targeting or purification of the protein.

As used herein, "immunoglobulin peptides" may comprise an immunoglobulin heavy chain or a portion thereof. In one embodiment, the portion of the heavy chain may be the Fc
30 fragment or a portion thereof. As used herein, the Fc fragment comprises the heavy chain hinge polypeptide, and the C_H2 and C_H3 domains of the heavy chain of an immunoglobulin, in either monomeric or dimeric form. Or, the C_H1 and Fc fragment may be used as the immunoglobulin polypeptide. The heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain isotypes: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ), or IgA (α). In

addition, the heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain subtypes: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), or mutations of these isotypes or subtypes that alter the biological activity. An example of biological activity that may be altered includes reduction of an isotype's ability to bind to some Fc receptors as for example, by modification of the hinge region.

The terms "identity" or "percent identical" refers to sequence identity between two amino acid sequences or between two nucleic acid sequences. Percent identity can be determined by aligning two sequences and refers to the number of identical residues (*i.e.*, amino acid or nucleotide) at positions shared by the compared sequences. Sequence alignment and comparison may be conducted using the algorithms standard in the art (*e.g.* Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85:2444) or by computerized versions of these algorithms (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI) publicly available as BLAST and FASTA. Also, ENTREZ, available through the National Institutes of Health, Bethesda MD, may be used for sequence comparison. In one embodiment, the percent identity of two sequences may be determined using GCG with a gap weight of 1, such that each amino acid gap is weighted as if it were a single amino acid mismatch between the two sequences.

As used herein, the term "conserved residues" refers to amino acids that are the same among a plurality of proteins having the same structure and/or function. A region of conserved residues may be important for protein structure or function. Thus, contiguous conserved residues as identified in a three-dimensional protein may be important for protein structure or function. To find conserved residues, or conserved regions of 3-D structure, a comparison of sequences for the same or similar proteins from different species, or of individuals of the same species, may be made.

As used herein, the term "homologue" means a polypeptide having a degree of homology with the wild-type amino acid sequence. Homology comparisons can be conducted by eye, or more usually, with the aid of readily available sequence comparison programs. These commercially available computer programs can calculate percent homology between two or more sequences (*e.g.* Wilbur, W. J. and Lipman, D. J., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:726-730). For example, homologous sequences may be taken to include an amino acid sequences which in alternate embodiments are at least 75% identical, 85% identical, 90% identical, 95% identical, or 98% identical to each other.

As used herein, a polypeptide or protein "domain" comprises a region along a polypeptide or protein that comprises an independent unit. Domains may be defined in terms of structure, sequence and/or biological activity. In one embodiment, a polypeptide domain may comprise a region of a protein that folds in a manner that is substantially independent from the rest of the protein. Domains may be identified using domain databases such as, but not limited to PFAM, PRODOM, PROSITE, BLOCKS, PRINTS, SBASE, ISREC PROFILES, SAMRT, and PROCLASS.

As used herein, "immunoglobulin domain" is a sequence of amino acids that is structurally homologous, or identical to, a domain of an immunoglobulin. The length of the sequence of amino acids of an immunoglobulin domain may be any length. In one embodiment, an immunoglobulin domain may be less than 250 amino acids. In an example embodiment, an immunoglobulin domain may be about 80-150 amino acids in length. For example, the variable region, and the C_H1, C_H2, and C_H3 regions of an IgG are each immunoglobulin domains. In another example, the variable, the C_H1, C_H2, C_H3 and C_H4 regions of an IgM are each immunoglobulin domains.

As used herein, a "RAGE immunoglobulin domain" is a sequence of amino acids from RAGE protein that is structurally homologous, or identical to, a domain of an immunoglobulin. For example, a RAGE immunoglobulin domain may comprise the RAGE V-domain, the RAGE Ig-like C2-type 1 domain ("C1 domain"), or the RAGE Ig-like C2-type 2 domain ("C2 domain").

As used herein, an "interdomain linker" comprises a polypeptide that joins two domains together. An Fc hinge region is an example of an interdomain linker in an IgG.

As used herein, "directly linked" identifies a covalent linkage between two different groups (e.g., nucleic acid sequences, polypeptides, polypeptide domains) that does not have any intervening atoms between the two groups that are being linked.

As used herein, "ligand binding domain" refers to a domain of a protein responsible for binding a ligand. The term ligand binding domain includes homologues of a ligand binding domain or portions thereof. In this regard, deliberate amino acid substitutions may be made in the ligand binding site on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, or hydrophilicity of the residues, as long as the binding specificity of the ligand binding domain is retained.

As used herein, a "ligand binding site" comprises residues in a protein that directly interact with a ligand, or residues involved in positioning the ligand in close proximity to those residues that directly interact with the ligand. The interaction of residues in the ligand

34

binding site may be defined by the spatial proximity of the residues to a ligand in the model or structure. The term ligand binding site includes homologues of a ligand binding site, or portions thereof. In this regard, deliberate amino acid substitutions may be made in the ligand binding site on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, or hydrophilicity of the residues, as long as the binding specificity of the ligand binding site is retained. A ligand binding site may exist in one or more ligand binding domains of a protein or polypeptide.

As used herein, the term "interact" refers to a condition of proximity between a ligand or compound, or portions or fragments thereof, and a portion of a second molecule of interest. The interaction may be non-covalent, for example, as a result of hydrogen-bonding, van der Waals interactions, or electrostatic or hydrophobic interactions, or it may be covalent.

As used herein, a "ligand" refers to a molecule or compound or entity that interacts with a ligand binding site, including substrates or analogues or parts thereof. As described herein, the term "ligand" may refer to compounds that bind to the protein of interest. A ligand may be an agonist, an antagonist, or a modulator. Or, a ligand may not have a biological effect. Or, a ligand may block the binding of other ligands thereby inhibiting a biological effect. Ligands may include, but are not limited to, small molecule inhibitors. These small molecules may include peptides, peptidomimetics, organic compounds and the like. Ligands may also include polypeptides and/or proteins.

As used herein, a "modulator compound" refers to a molecule which changes or alters the biological activity of a molecule of interest. A modulator compound may increase or decrease activity, or change the physical or chemical characteristics, or functional or immunological properties, of the molecule of interest. For RAGE, a modulator compound may increase or decrease activity, or change the characteristics, or functional or immunological properties of the RAGE, or a portion thereof. A modulator compound may include natural and/or chemically synthesized or artificial peptides, modified peptides (e.g., phosphopeptides), antibodies, carbohydrates, monosaccharides, oligosaccharides, polysaccharides, glycolipids, heterocyclic compounds, nucleosides or nucleotides or parts thereof, and small organic or inorganic molecules. A modulator compound may be an endogenous physiological compound or it may be a natural or synthetic compound. Or, the modulator compound may be a small organic molecule. The term "modulator compound" also includes a chemically modified ligand or compound, and includes isomers and racemic forms.

An "agonist" comprises a compound that binds to a receptor to form a complex that elicits a pharmacological response specific to the receptor involved.

35

An "antagonist" comprises a compound that binds to an agonist or to a receptor to form a complex that does not give rise to a substantial pharmacological response and can inhibit the biological response induced by an agonist.

RAGE agonists may therefore bind to RAGE and stimulate RAGE-mediated cellular processes, and RAGE antagonists may inhibit RAGE-mediated processes from being stimulated by a RAGE agonist. For example, in one embodiment, the cellular process stimulated by RAGE agonists comprises activation of TNF- α gene transcription.

The term "peptide mimetics" refers to structures that serve as substitutes for peptides in interactions between molecules (Morgan et al., 1989, *Ann. Reports Med. Chem.*, 24:243-252). Peptide mimetics may include synthetic structures that may or may not contain amino acids and/or peptide bonds but that retain the structural and functional features of a peptide, or agonist, or antagonist. Peptide mimetics also include peptoids, oligopeptoids (Simon et al., 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:9367); and peptide libraries containing peptides of a designed length representing all possible sequences of amino acids corresponding to a peptide, or agonist or antagonist of the invention.

The term "treating" refers to improving a symptom of a disease or disorder and may comprise curing the disorder, substantially preventing the onset of the disorder, or improving the subject's condition. The term "treatment" as used herein, refers to the full spectrum of treatments for a given disorder from which the patient is suffering, including alleviation of one symptom or most of the symptoms resulting from that disorder, a cure for the particular disorder, or prevention of the onset of the disorder.

As used herein, the term "EC50" is defined as the concentration of an agent that results in 50% of a measured biological effect. For example, the EC50 of a therapeutic agent having a measurable biological effect may comprise the value at which the agent displays 50% of the biological effect.

As used herein, the term "IC50" is defined as the concentration of an agent that results in 50% inhibition of a measured effect. For example, the IC50 of an antagonist of RAGE binding may comprise the value at which the antagonist reduces ligand binding to the ligand binding site of RAGE by 50%.

As used herein, an "effective amount" means the amount of an agent that is effective for producing a desired effect in a subject. The term "therapeutically effective amount" denotes that amount of a drug or pharmaceutical agent that will elicit therapeutic response of

an animal or human that is being sought. The actual dose which comprises the effective amount may depend upon the route of administration, the size and health of the subject, the disorder being treated, and the like. 36

The term "pharmaceutically acceptable carrier" as used herein may refer to compounds and compositions that are suitable for use in human or animal subjects, as for example, for therapeutic compositions administered for the treatment of a RAGE-mediated disorder or disease.

The term "pharmaceutical composition" is used herein to denote a composition that may be administered to a mammalian host, e.g., orally, parenterally, topically, by inhalation spray, intranasally, or rectally, in unit dosage formulations containing conventional non-toxic carriers, diluents, adjuvants, vehicles and the like.

The term "parenteral" as used herein, includes subcutaneous injections, intravenous, intramuscular, intracisternal injection, or infusion techniques.

RAGE Fusion Proteins

Embodiments of the present invention comprise RAGE fusion proteins, methods of making such fusion proteins, and methods of use of such fusion proteins. The present invention may be embodied in a variety of ways.

For example, embodiments of the present invention provide fusion proteins comprising a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide. In one embodiment, the fusion protein may comprise a RAGE ligand binding site. In an embodiment, the ligand binding site comprises the most N-terminal domain of the fusion protein. The RAGE ligand binding site may comprise the V domain of RAGE, or a portion thereof. In an embodiment, the RAGE ligand binding site comprises SEQ ID NO: 9 or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10 or a sequence 90% identical thereto.

In an embodiment, the RAGE polypeptide may be linked to a polypeptide comprising an immunoglobulin domain or a portion (e.g., a fragment thereof) of an immunoglobulin domain. In one embodiment, the polypeptide comprising an immunoglobulin domain comprises at least a portion of at least one of the C_H2 or the C_H3 domains of a human IgG.

A RAGE protein or polypeptide may comprise full-length human RAGE protein (e.g., SEQ ID NO: 1), or a fragment of human RAGE. As used herein, a fragment of a RAGE polypeptide is at least 5 amino acids in length, may be greater than 30 amino acids in length, but is less than the full amino acid sequence. In alternate embodiments, the RAGE polypeptide may comprise a sequence that is 70%, or 80%, or 85%, or 90% identical to human RAGE, or a fragment thereof. For example, in one embodiment, the RAGE

37
polypeptide may comprise human RAGE, or a fragment thereof, with Glycine as the first residue rather than a Methionine (see e.g., Neeper *et al.*, (1992)). Or, the human RAGE may comprise full-length RAGE with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 3) (FIGS. 1A and 1B) or a portion of that amino acid sequence.

5 The fusion proteins of the present invention may also comprise sRAGE (e.g., SEQ ID NO: 4), a polypeptide 90% identical to sRAGE, or a fragment of sRAGE. As used herein, sRAGE is the RAGE protein that does not include the transmembrane region or the cytoplasmic tail (Park *et al.*, *Nature Med.*, 4:1025-1031 (1998)). For example, the RAGE polypeptide may comprise human sRAGE, or a fragment thereof, with Glycine as the first
10 residue rather than a Methionine (see e.g., Neeper *et al.*, (1992)). Or, a RAGE polypeptide may comprise human sRAGE with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6) (FIG. 1C) or a portion of that amino acid sequence.

In other embodiments, the RAGE protein may comprise a RAGE V domain (e.g., SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 8; FIG. 1D) (Neeper *et al.*, (1992); Schmidt *et al.* (1997)). Or,
15 a sequence 90% identical to the RAGE V domain or a fragment thereof may be used.

Or, the RAGE protein may comprise a fragment of the RAGE V domain (e.g., SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 10, FIG. 1D). In one embodiment the RAGE protein may comprise a ligand binding site. In an embodiment, the ligand binding site may comprise
20 SEQ ID NO: 9, or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10, or a sequence 90% identical thereto. In yet another embodiment, the RAGE fragment is a synthetic peptide.

Thus, the RAGE polypeptide used in the fusion proteins of the present invention may comprise a fragment of full length RAGE. As is known in the art, RAGE comprises three immunoglobulin-like polypeptide domains, the V domain, and the C1 and C2 domains each
25 linked to each other by an interdomain linker. Full-length RAGE also includes a transmembrane polypeptide and a cytoplasmic tail downstream (C-terminal) of the C2 domain, and linked to the C2 domain.

In an embodiment, the RAGE polypeptide does not include any signal sequence residues. The signal sequence of RAGE may comprise either residues 1-22 or residues 1-23 of full length RAGE.

30 For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-116 of human RAGE (SEQ ID NO: 7) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-116 of human RAGE (SEQ ID NO: 8) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V domain of RAGE. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 124-221 of human RAGE (SEQ ID NO: 11) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the C1

domain of RAGE. In another embodiment, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 227-317 of human RAGE (SEQ ID NO: 12) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the C2 domain of RAGE. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-123 of human RAGE (SEQ ID NO: 13) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-123 of human RAGE (SEQ ID NO: 14) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V domain of RAGE and a downstream interdomain linker. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-226 of human RAGE (SEQ ID NO: 17) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-226 of human RAGE (SEQ ID NO: 18) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V-domain, the C1 domain and the interdomain linker linking these two domains. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-339 of human RAGE (SEQ ID NO: 5) or a sequence 90% identical thereto, or 24-339 of human RAGE (SEQ ID NO: 6) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to sRAGE (i.e., encoding the V, C1, and C2 domains and interdomain linkers). Or, fragments of each of these sequences may be used.

The fusion protein may include several types of peptides that are not derived from RAGE or a fragment thereof. The second polypeptide of the fusion protein may comprise a polypeptide derived from an immunoglobulin. In one embodiment, the immunoglobulin polypeptide may comprise an immunoglobulin heavy chain or a portion (i.e., fragment) thereof. For example, the heavy chain fragment may comprise a polypeptide derived from the Fc fragment of an immunoglobulin, wherein the Fc fragment comprises the heavy chain hinge polypeptide, and C_H2 and C_H3 domains of the immunoglobulin heavy chain as a monomer. The heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain isotypes: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ε), or IgA (α). In addition, the heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain subtypes: IgG1 (γ1), IgG2 (γ2), IgG3 (γ3), IgG4 (γ4), IgA1 (α1), IgA2 (α2), or mutations of these isotypes or subtypes that alter the biological activity. The second polypeptide may comprise the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or portions of either, or both, of these domains. As an example embodiments, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion thereof may comprise SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 40.

The Fc portion of the immunoglobulin chain may be proinflammatory *in vivo*. Thus, in one embodiment, the RAGE fusion protein of the present invention comprises an interdomain linker derived from RAGE rather than an interdomain hinge polypeptide derived from an immunoglobulin.

39

Thus in one embodiment, the fusion protein may further comprise a RAGE polypeptide directly linked to a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a fragment or portion of the C_H2 domain of an immunoglobulin. In one embodiment, the C_H2 domain, or a fragment thereof comprises SEQ ID NO: 42. In one embodiment, the RAGE polypeptide may comprise a ligand binding site. The RAGE ligand binding site may comprise the V domain of RAGE, or a portion thereof. In an embodiment, the RAGE ligand binding site comprises SEQ ID NO: 9 or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10 or a sequence 90% identical thereto.

The RAGE polypeptide used in the fusion proteins of the present invention may comprise a RAGE immunoglobulin domain. Additionally or alternatively, the fragment of RAGE may comprise an interdomain linker. Or, the RAGE polypeptide may comprise a RAGE immunoglobulin domain linked to an upstream (i.e., closer to the N-terminus) or downstream (i.e., closer to the C-terminus) interdomain linker. In yet another embodiment, the RAGE polypeptide may comprise two (or more) RAGE immunoglobulin domains each linked to each other by an interdomain linker. The RAGE polypeptide may further comprise multiple RAGE immunoglobulin domains linked to each other by one or more interdomain linkers and having a terminal interdomain linker attached to the N-terminal RAGE immunoglobulin domain and/or the C-terminal immunoglobulin domain. Additional combinations of RAGE immunoglobulin domains and interdomain linkers are within the scope of the present invention.

In one embodiment, the RAGE polypeptide comprises a RAGE interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain such that the C-terminal amino acid of the RAGE immunoglobulin domain is linked to the N-terminal amino acid of the interdomain linker, and the C-terminal amino acid of the RAGE interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a fragment thereof. The polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin may comprise the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion of either, or both, of these domains. As an example embodiment, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains, or a portion thereof, of a human IgG1 may comprise SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 40.

As described above, the fusion protein of the present invention may comprise a single or multiple domains from RAGE. Also, the RAGE polypeptide comprising an interdomain linker linked to a RAGE polypeptide domain may comprise a fragment of full-length RAGE protein. For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-136 of human

RAGE (SEQ ID NO: 15) or a sequence 90% identical thereto or amino acids 24-136 of human RAGE (SEQ ID NO: 16) or a sequence 90% identical thereto corresponding to the V domain of RAGE and a downstream interdomain linker. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-251 of human RAGE (SEQ ID NO: 19) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-251 of human RAGE (SEQ ID NO: 20) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V-domain, the C1 domain, the interdomain linker linking these two domains, and a second interdomain linker downstream of C1.

For example, in one embodiment, the fusion protein may comprise two immunoglobulin domains derived from RAGE protein and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. The fusion protein may comprise a first RAGE immunoglobulin domain and a first RAGE interdomain linker linked to a second RAGE immunoglobulin domain and a second RAGE interdomain linker, such that the N-terminal amino acid of the first interdomain linker is linked to the C-terminal amino acid of the first RAGE immunoglobulin domain, the N-terminal amino acid of the second RAGE immunoglobulin domain is linked to C-terminal amino acid of the first interdomain linker, the N-terminal amino acid of the second interdomain linker is linked to C-terminal amino acid of the second RAGE immunoglobulin domain, and the C-terminal amino acid of the RAGE second interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of the C_H2 immunoglobulin domain. In one embodiment, a four domain RAGE fusion protein may comprise SEQ ID NO: 32. In alternate embodiments, a four domain RAGE fusion protein comprises SEQ ID NO: 33 or SEQ ID NO: 34.

Alternatively, a three domain fusion protein may comprise one immunoglobulin domain derived from RAGE and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. For example, the fusion protein may comprise a single RAGE immunoglobulin domain linked via a RAGE interdomain linker to the N-terminal amino acid of a C_H2 immunoglobulin domain or a portion of a C_H2 immunoglobulin domain. In one embodiment, a three domain RAGE fusion protein may comprise SEQ ID NO: 35. In alternate embodiments, a three domain RAGE fusion protein may comprise SEQ ID NO: 36 or SEQ ID NO: 37.

A RAGE interdomain linker fragment may comprise a peptide sequence that is naturally downstream of, and thus, linked to, a RAGE immunoglobulin domain. For example, for the RAGE V domain, the interdomain linker may comprise amino acid sequences that are naturally downstream from the V domain. In an embodiment, the linker may comprise SEQ ID NO: 21, corresponding to amino acids 117-123 of full-length RAGE.

41

Or, the linker may comprise a peptide having additional portions of the natural RAGE sequence. For example, an interdomain linker comprising several amino acids (e.g., 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids) upstream and downstream of SEQ ID NO: 21 may be used. Thus, in one embodiment, the interdomain linker comprises SEQ ID NO: 23 comprising amino acids 117-136 of full-length RAGE. Or, fragments of SEQ ID NO: 21 deleting, for example, 1, 2, or 3, amino acids from either end of the linker may be used. In alternate embodiments, the linker may comprise a sequence that is 70% identical, or 80% identical, or 90% identical to SEQ ID NO: 21 or SEQ ID NO: 23.

For the RAGE C1 domain, the linker may comprise peptide sequence that is naturally downstream of the C1 domain. In an embodiment, the linker may comprise SEQ ID NO: 22, corresponding to amino acids 222-251 of full-length RAGE. Or, the linker may comprise a peptide having additional portions of the natural RAGE sequence. For example, a linker comprising several (1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids) amino acids upstream and downstream of SEQ ID NO: 22 may be used. Or, fragments of SEQ ID NO: 22 may be used, deleting for example, 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids from either end of the linker. For example, in one embodiment, a RAGE interdomain linker may comprise SEQ ID NO: 24, corresponding to amino acids 222-226. Or an interdomain linker may comprise SEQ ID NO: 44, corresponding to RAGE amino acids 318-342.

Methods of Producing RAGE Fusion Proteins

The present invention also comprises a method to make a RAGE fusion protein. Thus, in one embodiment, the present invention comprises a method of making a RAGE fusion protein comprising the step of covalently linking a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide wherein the RAGE polypeptide comprises a RAGE ligand binding site. For example, the linked RAGE polypeptide and the second, non-RAGE polypeptide may be encoded by a recombinant DNA construct. The method may further comprise the step of incorporating the DNA construct into an expression vector. Also, the method may comprise the step of inserting the expression vector into a host cell.

For example, embodiments of the present invention provide fusion proteins comprising a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide. In one embodiment, the fusion protein may comprise a RAGE ligand binding site. In an embodiment, the ligand binding site comprises the most N-terminal domain of the fusion protein. The RAGE ligand binding site may comprise the V domain of RAGE, or a portion thereof. In an embodiment, the RAGE ligand binding site comprises SEQ ID NO: 9 or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10 or a sequence 90% identical thereto.

In an embodiment, the RAGE polypeptide may be linked to a polypeptide comprising an immunoglobulin domain or a portion (e.g., a fragment thereof) of an immunoglobulin domain. In one embodiment, the polypeptide comprising an immunoglobulin domain comprises at least a portion of at least one of the C_H2 or the C_H3 domains of a human IgG.

42

5 The fusion protein may be engineered by recombinant DNA techniques. For example, in one embodiment, the present invention may comprise an isolated nucleic acid sequence encoding a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide. In an embodiment, the RAGE polypeptide may comprise a RAGE ligand binding site.

10 The RAGE protein or polypeptide may comprise full-length human RAGE (e.g., SEQ ID NO: 1), or a fragment of human RAGE. In an embodiment, the RAGE polypeptide does not include any signal sequence residues. The signal sequence of RAGE may comprise either residues 1-22 or residues 1-23 of full length RAGE (SEQ ID NO: 1). In alternate embodiments, the RAGE polypeptide may comprise a sequence 70%, or 80%, or 90% identical to human RAGE, or a fragment thereof. For example, in one embodiment, the RAGE polypeptide may comprise human RAGE, or a fragment thereof, with Glycine as the first residue rather than a Methionine (see e.g., Neeper *et al.*, (1992)). Or, the human RAGE may comprise full-length RAGE with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 3) (FIGS. 1A and 1B) or a portion of that amino acid sequence. The fusion proteins of the present invention may also comprise sRAGE (e.g., SEQ ID NO: 4), a polypeptide 90% identical to sRAGE, or a fragment of sRAGE. For example, the RAGE polypeptide may comprise human sRAGE, or a fragment thereof, with Glycine as the first residue rather than a Methionine (see e.g., Neeper *et al.*, (1992)). Or, the human RAGE may comprise sRAGE with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6) (FIG. 1C) or a portion of that amino acid sequence. In other embodiments, the RAGE protein may comprise a V domain (e.g., SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 8; FIG. 1D). Or, a sequence 90% identical to the V domain or a fragment thereof may be used. Or, the RAGE protein may comprise a fragment of RAGE comprising a portion of the V domain (e.g., SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 10, FIG. 1D). In an embodiment, the ligand binding site may comprise SEQ ID NO: 9, or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10, or a sequence 90% identical thereto. In yet another embodiment, the RAGE fragment is a synthetic peptide.

In an embodiment, the nucleic acid sequence comprises SEQ ID NO: 25 to encode amino acids 1-118 of human RAGE or a fragment thereof. For example, a sequence comprising nucleotides 1- 348 of SEQ ID NO: 25 may be used to encode amino acids 1-116 of human RAGE. Or, the nucleic acid may comprise SEQ ID NO: 26 to encode amino acids

43

1-123 of human RAGE. Or, the nucleic acid may comprise SEQ ID NO: 27 to encode amino acids 1-136 of human RAGE. Or, the nucleic acid may comprise SEQ ID NO: 28 to encode amino acids 1-230 of human RAGE. Or, the nucleic acid may comprise SEQ ID NO: 29 to encode amino acids 1-251 of human RAGE. Or fragments of these nucleic acid sequences may be used to encode RAGE polypeptide fragments.

The fusion protein may include several types of peptides that are not derived from RAGE or a fragment thereof. The second polypeptide of the fusion protein may comprise a polypeptide derived from an immunoglobulin. The heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain isotypes: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ), or IgA (α). In addition, the heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain subtypes: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), or mutations of these isotypes or subtypes that alter the biological activity. The second polypeptide may comprise the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion of either, or both, of these domains. As an example embodiment, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion thereof may comprise SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 40. The immunoglobulin peptide may be encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 39 or SEQ ID NO: 41.

The Fc portion of the immunoglobulin chain may be proinflammatory *in vivo*. Thus, the RAGE fusion protein of the present invention may comprise an interdomain linker derived from RAGE rather than an interdomain hinge polypeptide derived from an immunoglobulin. For example, in one embodiment, the fusion protein may be encoded by a recombinant DNA construct. Also, the method may comprise the step of incorporating the DNA construct into an expression vector. Also, the method may comprise transfecting the expression vector into a host cell.

Thus, in one embodiment, the present invention comprises a method of making a RAGE fusion protein comprising the step of covalently linking a RAGE polypeptide to a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin or a portion of a C_H2 domain of an immunoglobulin. In one embodiment, the fusion protein may comprise a RAGE ligand binding site. The RAGE ligand binding site may comprise the V domain of RAGE, or a portion thereof. In an embodiment, the RAGE ligand binding site comprises SEQ ID NO: 9 or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10 or a sequence 90% identical thereto.

For example, in one embodiment, the present invention comprises a nucleic acid encoding a RAGE polypeptide directly linked to a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a fragment thereof. In one embodiment, the C_H2 domain, or a

fragment thereof, comprises SEQ ID NO: 42. The second polypeptide may comprise the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1. As an example embodiment, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 may comprise SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 40. The immunoglobulin peptide may be encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 39 or SEQ ID NO: 41.

In one embodiment, the RAGE polypeptide may comprise a RAGE interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain such that the C-terminal amino acid of the RAGE immunoglobulin domain is linked to the N-terminal amino acid of the interdomain linker, and the C-terminal amino acid of the RAGE interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a fragment thereof. The polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin may comprise a polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion of both, or either, of these domains. As an example embodiment, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1, or a portion thereof, may comprise SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 40.

The fusion protein of the present invention may comprise a single or multiple domains from RAGE. Also, the RAGE polypeptide comprising an interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain may comprise a fragment of a full-length RAGE protein. For example, in one embodiment, the fusion protein may comprise two immunoglobulin domains derived from RAGE protein and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. The fusion protein may comprise a first RAGE immunoglobulin domain and a first interdomain linker linked to a second RAGE immunoglobulin domain and a second RAGE interdomain linker, such that the N-terminal amino acid of the first interdomain linker is linked to the C-terminal amino acid of the first RAGE immunoglobulin domain, the N-terminal amino acid of the second RAGE immunoglobulin domain is linked to C-terminal amino acid of the first interdomain linker, the N-terminal amino acid of the second interdomain linker is linked to C-terminal amino acid of the RAGE second immunoglobulin domain, and the C-terminal amino acid of the RAGE second interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of the polypeptide comprising a C_H2 immunoglobulin domain or fragment thereof. For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-251 of human RAGE (SEQ ID NO: 19) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-251 of human RAGE (SEQ ID NO: 20) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V-domain, the C1 domain, the interdomain linker linking these two domains, and a second interdomain linker downstream of C1. In one

embodiment, a nucleic acid construct comprising SEQ ID NO: 30 or a fragment thereof may encode for a four domain RAGE fusion protein.

45

Alternatively, a three domain fusion protein may comprise one immunoglobulin domain derived from RAGE and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. For example, the fusion protein may comprise a single RAGE immunoglobulin domain linked via a RAGE interdomain linker to the N-terminal amino acid of the polypeptide comprising a C_H2 immunoglobulin domain or a fragment thereof. For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-136 of human RAGE (SEQ ID NO: 15) or a sequence 90% identical thereto or amino acids 24-136 of human RAGE (SEQ ID NO: 16) or a sequence 90% identical thereto corresponding to the V domain of RAGE and a downstream interdomain linker. In one embodiment, a nucleic acid construct comprising SEQ ID NO: 31 or a fragment thereof may encode for a three domain RAGE fusion protein.

A RAGE interdomain linker fragment may comprise a peptide sequence that is naturally downstream of, and thus, linked to, a RAGE immunoglobulin domain. For example, for the RAGE V domain, the interdomain linker may comprise amino acid sequences that are naturally downstream from the V domain. In an embodiment, the linker may comprise SEQ ID NO: 21, corresponding to amino acids 117-123 of full-length RAGE. Or, the linker may comprise a peptide having additional portions of the natural RAGE sequence. For example, a interdomain linker comprising several amino acids (e.g., 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids) upstream and downstream of SEQ ID NO: 21 may be used. Thus, in one embodiment, the interdomain linker comprises SEQ ID NO: 23 comprising amino acids 117-136 of full-length RAGE. Or, fragments of SEQ ID NO: 21 deleting, for example, 1, 2, or 3, amino acids from either end of the linker may be used. In alternate embodiments, the linker may comprise a sequence that is 70% identical, or 80% identical, or 90% identical to SEQ ID NO: 21 or SEQ ID NO: 23.

For the RAGE C1 domain, the linker may comprise peptide sequence that is naturally downstream of the C1 domain. In an embodiment, the linker may comprise SEQ ID NO: 22, corresponding to amino acids 222-251 of full-length RAGE. Or, the linker may comprise a peptide having additional portions of the natural RAGE sequence. For example, a linker comprising several (1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids) amino acids upstream and downstream of SEQ ID NO: 22 may be used. Or, fragments of SEQ ID NO: 22 may be used, deleting for example, 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids from either end of the linker. For example, in one embodiment, a RAGE interdomain linker may comprise SEQ ID NO: 24,

corresponding to amino acids 222-226. Or an interdomain linker may comprise SEQ ID NO: 44, corresponding to RAGE amino acids 318-342. 46

The method may further comprise the step of incorporating the DNA construct into an expression vector. Thus, in a embodiment, the present invention comprises an expression vector that encodes for a fusion protein comprising a RAGE polypeptide directly linked to a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin or a portion of a C_H2 domain of an immunoglobulin. In an embodiment, the RAGE polypeptide comprise constructs, such as those described herein, having a RAGE interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain such that the C-terminal amino acid of the RAGE immunoglobulin domain is linked to the N-terminal amino acid of the interdomain linker, and the C-terminal amino acid of the RAGE interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a portion thereof. For example, the expression vector used to transfect the cells may comprise the nucleic acid sequence SEQ ID NO:30, or a fragment thereof, or SEQ ID NO: 31, or a fragment thereof.

The method may further comprise the step of transfecting a cell with the expression vector of the present invention. Thus, in an embodiment, the present invention comprises a cell transfected with the expression vector that expressed the RAGE fusion protein of the present invention, such that the cell expresses a fusion protein comprising a RAGE polypeptide directly linked to a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin or a portion of a C_H2 domain of an immunoglobulin. In an embodiment, the RAGE polypeptide comprise constructs, such as those described herein, having a RAGE interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain such that the C-terminal amino acid of the RAGE immunoglobulin domain is linked to the N-terminal amino acid of the interdomain linker, and the C-terminal amino acid of the RAGE interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a portion thereof. For example, the expression vector may comprise the nucleic acid sequence SEQ ID NO:30, or a fragment thereof, or SEQ ID NO: 31, or a fragment thereof.

For example, plasmids may be constructed to express RAGE-IgG Fc fusion proteins by fusing different lengths of a 5' cDNA sequence of human RAGE with a 3' cDNA sequence of human IgG1 Fc (γ1). The expression cassette sequences may be inserted into an expression vector such as pcDNA3.1 expression vector (Invitrogen, CA) using standard recombinant techniques.

Also, the method may comprise transfecting the expression vector into a host cell. In one embodiment, the recombinant may be transfected into Chinese Hamster Ovary cells and

expression optimized. In alternate embodiments, the cells may produce 0.1 to 20 grams/liter, or 0.5 to 10 grams/liter, or about 1-2 grams/liter. 47

As is known in the art, such nucleic acid constructs may be modified by mutation, as for example, by PCR amplification of a nucleic acid template with primers comprising the mutation of interest. In this way, polypeptides comprising varying affinity for RAGE ligands may be designed. In one embodiment, the mutated sequences may be 90% or more identical to the starting DNA. As such, variants may include nucleotide sequences that hybridize under stringent conditions (i.e., equivalent to about 20-27°C below the melting temperature (T_M) of the DNA duplex in 1 molar salt).

The coding sequence may be expressed by transfecting the expression vector into an appropriate host. For example, the recombinant vectors may be stably transfected into Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, and cells expressing the fusion protein selected and cloned. In an embodiment, cells expressing the recombinant construct are selected for plasmid-encoded neomycin resistance by applying antibiotic G418. Individual clones may be selected and clones expressing high levels of recombinant protein as detected by Western Blot analysis of the cell supernatant may be expanded, and the gene product purified by affinity chromatography using Protein A columns.

Sample embodiments of recombinant nucleic acids that encode the fusion proteins of the present invention are shown in FIGS. 2-5. For example, as described above, the fusion protein produced by the recombinant DNA construct may comprise a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide. The fusion protein may comprise two domains derived from RAGE protein and two domains derived from an immunoglobulin.. An example nucleic acid construct encoding a fusion protein, TTP-4000 (TT4), having this type of structure is shown as FIG. 2 (SEQ ID NO: 30). As shown in FIG. 2, coding sequence 1-753 (highlighted in bold) encodes the RAGE N-terminal protein sequence whereas the sequence from 754-1386 encodes the IgG Fc protein sequence.

When derived from SEQ ID NO: 30, or a sequence 90% identical thereto, the fusion protein may comprise the four domain amino acid sequence of SEQ ID NO: 32, or the polypeptide with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 33 or SEQ ID NO: 34) (FIG. 4). In FIG. 4, the RAGE amino acid sequence is highlighted with bold font. The immunoglobulin sequence is the C_H2 and C_H3 immunoglobulin domains of IgG. As shown in FIG. 6B, the first 251 amino acids of the full-length TTP-4000 RAGE fusion protein contains as the RAGE polypeptide sequence a signal sequence comprising amino acids 1-22/23, the V immunoglobulin domain (including the ligand binding site) comprising amino

48

acids 23/24-116, an interdomain linker comprising amino acids 117 to 123, a second immunoglobulin domain (C1) comprising amino acids 124-221, and a downstream interdomain linker comprising amino acids 222-251.

In an embodiment, the fusion protein may not necessarily comprise the second RAGE immunoglobulin domain. For example, the fusion protein may comprise one immunoglobulin domain derived from RAGE and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. An example nucleic acid construct encoding this type of fusion protein is shown as FIG. 3 (SEQ ID NO: 31). As shown in FIG. 3, the coding sequence from nucleotides 1 to 408 (highlighted in bold) encodes the RAGE N-terminal protein sequence, whereas the sequence from 409-1041 codes the IgG1 Fc (γ 1) protein sequence.

When derived from SEQ ID NO: 31, or a sequence 90% identical thereto, the fusion protein may comprise the three domain amino acid sequence of SEQ ID NO: 35, or the polypeptide with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 36 or SEQ ID NO: 37) (FIG. 5). In FIG. 5, the RAGE amino acid sequence is highlighted with bold font. As shown in FIG. 6B, the first 136 amino acids of the full-length TTP-3000 RAGE fusion protein contains as the RAGE polypeptide a signal sequence comprising amino acids 1-22/23, the V immunoglobulin domain (including the ligand binding site) comprising amino acids 23/24-116, and an interdomain linker comprising amino acids 117 to 136. The sequence from 137 to 346 includes the C_H2 and C_H3 immunoglobulin domains of IgG.

The fusion proteins of the present invention may comprise improved *in vivo* stability over RAGE polypeptides not comprising a second polypeptide. The fusion protein may be further modified to increase stability, efficacy, potency and bioavailability. Thus, the fusion proteins of the present invention may be modified by post-translational processing or by chemical modification. For example, the fusion protein may be synthetically prepared to include L-, D-, or unnatural amino acids, alpha-disubstituted amino acids, or N-alkyl amino acids. Additionally, proteins may be modified by acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, attachment of lipids such as phosphatidylinositol, formation of disulfide bonds, and the like. Furthermore, polyethylene glycol can be added to increase the biological stability of the fusion protein.

Binding of RAGE Antagonists to RAGE fusion proteins

49

The fusion proteins of the present invention may comprise a number of applications. For example, the fusion protein of the present invention may be used in a binding assay to identify RAGE ligands, such as RAGE agonists, antagonists, or modulators.

5 For example, in one embodiment, the present invention provides a method for detection of RAGE modulators comprising: (a) providing a fusion protein comprising a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide, where the RAGE polypeptide comprises a ligand binding site; (b) mixing a compound of interest and a ligand having a known binding affinity for RAGE with the fusion protein; and (c) measuring binding of the
10 known RAGE ligand to the RAGE fusion protein in the presence of the compound of interest. In an embodiment, the ligand binding site comprises the most N-terminal domain of the fusion protein.

The RAGE fusion proteins may also provide kits for the detection of RAGE modulators. For example, in one embodiment, a kit of the present invention may comprise
15 (a) a compound having known binding affinity to RAGE as a positive control; (b) a RAGE fusion protein comprising a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide, wherein the RAGE polypeptide comprises a RAGE ligand binding site; and (c) instructions for use. In an embodiment, the ligand binding site comprises the most N-terminal domain of the fusion protein.

20 The RAGE protein or polypeptide may comprise full-length human RAGE (e.g., SEQ ID NO: 1), or a fragment of human RAGE. In an embodiment, the RAGE polypeptide does not include any signal sequence residues. The signal sequence of RAGE may comprise either residues 1-22 or residues 1-23 of full length RAGE (SEQ ID NO: 1). In alternate
25 embodiments, the RAGE polypeptide may comprise a sequence 70%, 80%, or 90% identical to human RAGE, or a fragment thereof. For example, in one embodiment, the RAGE polypeptide may comprise human RAGE, or a fragment thereof, with Glycine as the first residue rather than a Methionine (see e.g., Neeper *et al.*, (1992)). Or, the human RAGE may comprise full-length RAGE with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 3) (FIGS. 1A and 1B) or a portion of that amino acid sequence. The fusion proteins
30 of the present invention may also comprise sRAGE (e.g., SEQ ID NO: 4), a polypeptide 90% identical to sRAGE, or a fragment of sRAGE. For example, the RAGE polypeptide may comprise human sRAGE, or a fragment thereof, with Glycine as the first residue rather than a Methionine (see e.g., Neeper *et al.*, (1992)). Or, the human RAGE may comprise sRAGE with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6) (FIG. 1C) or a

50
86

portion of that amino acid sequence. In other embodiments, the RAGE protein may comprise a V domain (e.g., SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 8; FIG. 1D). Or, a sequence 90% identical to the V domain or a fragment thereof may be used. Or, the RAGE protein may comprise a fragment of RAGE comprising a portion of the V domain (e.g., SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 10, FIG. 1D). In an embodiment, the ligand binding site may comprise SEQ ID NO: 9, or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10, or a sequence 90% identical thereto. In yet another embodiment, the RAGE fragment is a synthetic peptide.

The fusion protein may include several types of peptides that are not derived from RAGE or a fragment thereof. The second polypeptide of the fusion protein may comprise a polypeptide derived from an immunoglobulin. The heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain isotypes: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ), or IgA (α). In addition, the heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain subtypes: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), or mutations of these isotypes or subtypes that alter the biological activity. The second polypeptide may comprise the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion of either, or both, of these domains. As an example embodiments, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion thereof may comprise SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 40. The immunoglobulin peptide may be encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 39 or SEQ ID NO: 41.

The Fc portion of the immunoglobulin chain may be proinflammatory *in vivo*. Thus, the RAGE fusion protein of the present invention may comprise an Fc sequence derived from RAGE rather than an immunoglobulin chain. In an embodiment, the fusion protein may comprise a RAGE immunoglobulin domain linked to a polypeptide comprising a C_H2 immunoglobulin domain or a fragment thereof. In one embodiment, the RAGE polypeptide may comprise a RAGE interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain such that the C-terminal amino acid of the RAGE immunoglobulin domain is linked to the N-terminal amino acid of the interdomain linker, and the C-terminal amino acid of the RAGE interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a fragment thereof. The polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin may comprise a polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion of both, or either, of these domains. As an example embodiment, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1, or a portion thereof, may comprise SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 40.

57

The fusion protein of the present invention may comprise a single or multiple domains from RAGE. Also, the RAGE polypeptide comprising an interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain may comprise a fragment of a full-length RAGE protein. For example, in one embodiment, the fusion protein may comprise two immunoglobulin domains derived from RAGE protein and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. The fusion protein may comprise a first RAGE immunoglobulin domain and a first interdomain linker linked to a second RAGE immunoglobulin domain and a second RAGE interdomain linker, such that the N-terminal amino acid of the first interdomain linker is linked to the C-terminal amino acid of the first RAGE immunoglobulin domain, the N-terminal amino acid of the second RAGE immunoglobulin domain is linked to C-terminal amino acid of the first interdomain linker, the N-terminal amino acid of the second interdomain linker is linked to C-terminal amino acid of the RAGE second immunoglobulin domain, and the C-terminal amino acid of the RAGE second interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of the polypeptide comprising a C_H2 immunoglobulin domain or fragment thereof. For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-251 of human RAGE (SEQ ID NO: 19) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-251 of human RAGE (SEQ ID NO: 20) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V-domain, the C1 domain, the interdomain linker linking these two domains, and a second interdomain linker downstream of C1. In one embodiment, a nucleic acid construct comprising SEQ ID NO: 30 or a fragment thereof may encode for a four domain RAGE fusion protein.

Alternatively, a three domain fusion protein may comprise one immunoglobulin domain derived from RAGE and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. For example, the fusion protein may comprise a single RAGE immunoglobulin domain linked via a RAGE interdomain linker to the N-terminal amino acid of the polypeptide comprising a C_H2 immunoglobulin domain or a fragment thereof. For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-136 of human RAGE (SEQ ID NO: 15) or a sequence 90% identical thereto or amino acids 24-136 of human RAGE (SEQ ID NO: 16) or a sequence 90% identical thereto corresponding to the V domain of RAGE and a downstream interdomain linker. In one embodiment, a nucleic acid construct comprising SEQ ID NO: 31 or a fragment thereof may encode for a three domain RAGE fusion protein.

As described herein, RAGE interdomain linker fragment may comprise a peptide sequence that is naturally downstream of, and thus, linked to, a RAGE immunoglobulin domain. For example, for the RAGE V domain, the interdomain linker may comprise amino

52

acid sequences that are naturally downstream from the V domain. In an embodiment, the linker may comprise SEQ ID NO: 21, corresponding to amino acids 117-123 of full-length RAGE. Or, the linker may comprise a peptide having additional portions of the natural RAGE sequence. For example, a interdomain linker comprising several amino acids (e.g., 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids) upstream and downstream of SEQ ID NO: 21 may be used. Thus, in one embodiment, the interdomain linker comprises SEQ ID NO: 23 comprising amino acids 117-136 of full-length RAGE. Or, fragments of SEQ ID NO: 21 deleting, for example, 1, 2, or 3, amino acids from either end of the linker may be used. In alternate embodiments, the linker may comprise a sequence that is 70% identical, or 80% identical, or 90% identical to SEQ ID NO: 21 or SEQ ID NO: 23.

For the RAGE C1 domain, the linker may comprise peptide sequence that is naturally downstream of the C1 domain. In an embodiment, the linker may comprise SEQ ID NO: 22, corresponding to amino acids 222-251 of full-length RAGE. Or, the linker may comprise a peptide having additional portions of the natural RAGE sequence. For example, a linker comprising several (1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids) amino acids upstream and downstream of SEQ ID NO: 22 may be used. Or, fragments of SEQ ID NO: 22 may be used, deleting for example, 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids from either end of the linker. For example, in one embodiment, a RAGE interdomain linker may comprise SEQ ID NO: 24, corresponding to amino acids 222-226. Or an interdomain linker may comprise SEQ ID NO: 44, corresponding to RAGE amino acids 318-342.

For example, the RAGE fusion protein may be used in a binding assay to identify potential RAGE ligands. In one example embodiment of such a binding assay, a known RAGE ligand may coated onto a solid substrate (e.g., Maxisorb plates) at a concentration of about 5 micrograms per well, where each well contains a total volume of about 100 microliters (μ L). The plates may be incubated at 4°C overnight to allow the ligand to absorb. Alternatively, shorter incubation periods at higher temperature (e.g., room temperature) may be used. After a period of time to allow for the ligand to bind to the substrate, the assay wells may be aspirated and a blocking buffer (e.g., 1% BSA in 50 mM imidazole buffer, pH 7.2) may be added to block nonspecific binding. For example, blocking buffer may be added to the plates for 1 hour at room temperature. The plates may then be aspirated and/or washed with a wash buffer. In one embodiment, a buffer comprising 20 mM Imidazole, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 5 mM CaCl_2 and 5mM MgCl_2 , pH 7.2 may be used as a wash buffer. The fusion protein may then added at increasing dilutions to the assay wells. The RAGE fusion protein may then be allowed to incubate with the immobilized ligand in the assay well

such that binding can attain equilibrium. In one embodiment, the RAGE fusion protein is allowed to incubate with the immobilized ligand for about one hour at 37°C. In alternate embodiments, longer incubation periods at lower temperatures may be used. After the fusion protein and immobilized ligand have been incubated, the plate may be washed to remove any unbound fusion protein. The fusion protein bound to the immobilized ligand may be detected in a variety of ways. In one embodiment, detection employs an ELISA. Thus, in one embodiment, an immunodetection complex containing a monoclonal mouse anti-human IgG1, biotinylated goat anti-mouse IgG, and an avidin linked alkaline phosphatase may be added to the fusion protein immobilized in the assay well. The immunodetection complex may be allowed to bind to the immobilized fusion protein such that binding between the fusion protein and the immunodetection complex attains equilibrium. For example, the complex may be allowed to bind to the fusion protein for one hour at room temperature. At that point, any unbound complex may be removed by washing the assay well with wash buffer. The bound complex may be detected by adding the alkaline phosphatase substrate, *para*-nitrophenylphosphate (PNPP), and measuring conversion of PNPP to *para*-nitrophenol (PNP) as an increase in absorbance at 405 nm.

In an embodiment, RAGE ligand bind to the RAGE fusion protein with nanomolar (nM) or micromolar (μ M) affinity. An experiment illustrating binding of RAGE ligands to RAGE fusion proteins of the present invention is shown in FIG. 7. Solutions of TTP-3000 (TT3) and TTP-4000 (TT4) having initial concentrations of 1.082 mg/mL, and 370 μ g/mL, respectively, were prepared. As shown FIG. 7, at various dilutions, the fusion proteins TTP-3000 and TTP-4000 are able to bind to immobilized RAGE ligands Amyloid-beta (Abeta) (Amyloid Beta (1-40) from Biosource), S100b (S100), and amphoterin (Ampho), resulting in an increase in absorbance. In the absence of ligand (*i.e.*, coating with only BSA) there was no increase in absorbance.

The binding assay of the present invention may be used to quantify ligand binding to RAGE. In alternate embodiments, RAGE ligands may bind to the fusion protein of the present invention with binding affinities ranging from 0.1 to 1000 nanomolar (nM), or from 1 to 500 nM, or from 10 to 80 nM.

The fusion protein of the present invention may also be used to identify compounds having the ability to bind to RAGE. As shown in FIGS. 8 and 9, respectively, a RAGE ligand may be assayed for its ability to compete with immobilized amyloid beta for binding to TTP-4000 (TT4) or TTP-3000 (TT3) fusion proteins. Thus, it may be seen that a RAGE

ligand at a final assay concentration (FAC) of 10 μ M can displace binding of RAGE fusion protein to amyloid-beta at concentrations of 1:3, 1:10, 1:30, and 1:100 of the initial TTP-4000 solution (FIG. 8) or TTP-3000 (FIG. 9). 69

Modulation of Cellular Effectors

Embodiments of the fusion proteins of the present invention may be used to modulate a biological response mediated by RAGE. For example, the fusion proteins may be designed to modulate RAGE-induced increases in gene expression. Thus, in an embodiment, fusion proteins of the present invention may be used to modulate the function of biological enzymes. For example, the interaction between RAGE and its ligands may generate oxidative stress and activation of NF- κ B, and NF- κ B regulated genes, such as the cytokines IL-1 β , TNF- α , and the like. In addition, several other regulatory pathways, such as those involving p21ras, MAP kinases, ERK1, and ERK2, have been shown to be activated by binding of AGEs and other ligands to RAGE.

Use of the fusion proteins of the present invention to modulate expression of the cellular effector TNF- α is shown in FIG. 10. THP-1 myeloid cells may be cultured in RPMI-1640 media supplemented with 10% FBS and induced to secrete TNF- α via stimulation of RAGE with S100b. When such stimulation occurs in the presence of a RAGE fusion protein, induction of TNF- α by S100b binding to RAGE may be inhibited. Thus, as shown in FIG. 10, addition of 10 μ g TTP-3000 (TT3) or TTP-4000 (TT4) RAGE fusion protein reduces S100b induction of TNF- α by about 50% to 75%. Fusion protein TTP-4000 may be at least as effective in blocking S100b induction of TNF- α as is sRAGE (FIG. 10). Specificity of the inhibition for the RAGE sequences of TTP-4000 and TTP-3000 is shown by the experiment in which IgG alone was added to S100b stimulated cells. Addition of IgG and S100b to the assay shows the same levels of TNF- α as S100b alone.

Physiological Characteristics of RAGE Fusion Proteins

While sRAGE can have a therapeutic benefit in the modulation of RAGE-mediated diseases, human sRAGE may have limitations as a stand-alone therapeutic based on the relatively short half-life of sRAGE in plasma. For example, whereas rodent sRAGE has a half-life in normal and diabetic rats of approximately 20 hours, human sRAGE has a half-life of less than 2 hours when assessed by retention of immunoreactivity sRAGE (Renard *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290:1458-1466 (1999)).

To generate a RAGE therapeutic that has similar binding characteristics as sRAGE, but a more stable pharmacokinetic profile, a RAGE fusion protein comprising a RAGE ligand

binding site linked to one or more human immunoglobulin domains may be used. As is known in the art, the immunoglobulin domains may include the Fc portion of the immunoglobulin heavy chain.

The immunoglobulin Fc portion may confer several attributes to a fusion protein. For example, the Fc fusion protein may increase the serum half-life of such fusion proteins, often from hours to several days. The increase in pharmacokinetic stability is generally a result of the interaction of the linker between C_H2 and C_H3 regions of the Fc fragment with the FcRn receptor (Wines *et al.*, *J. Immunol.*, 164:5313-5318 (2000)).

Although fusion proteins comprising an immunoglobulin Fc polypeptide may provide the advantage of increased stability, immunoglobulin fusion proteins may elicit an inflammatory response when introduced into a host. The inflammatory response may be due, in large part, to the Fc portion of the immunoglobulin of the fusion protein. The proinflammatory response may be a desirable feature if the target is expressed on a diseased cell type that needs to be eliminated (*e.g.*, a cancer cell, an or a population of lymphocytes causing an autoimmune disease). The proinflammatory response may be a neutral feature if the target is a soluble protein, as most soluble proteins do not activate immunoglobulins. However, the proinflammatory response may be a negative feature if the target is expressed on cell types whose destruction would lead to untoward side-effects. Also, the proinflammatory response may be a negative feature if an inflammatory cascade is established at the site of a fusion protein binding to a tissue target, since many mediators of inflammation may be detrimental to surrounding tissue, and/or may cause systemic effects.

The primary proinflammatory site on immunoglobulin Fc fragments resides on the hinge region between the C_H1 and C_H2. This hinge region interacts with the FcR1-3 on various leukocytes and trigger these cells to attack the target. (Wines *et al.*, *J. Immunol.*, 164:5313-5318 (2000)).

As therapeutics for RAGE-mediated diseases, RAGE fusion proteins may not require the generation of an inflammatory response. Thus, embodiments of the RAGE fusion proteins of the present invention may comprise a fusion protein comprising a RAGE polypeptide linked to an immunoglobulin domain(s) where the Fc hinge region from the immunoglobulin is removed and replaced with a RAGE polypeptide. In this way, interaction between the RAGE fusion protein and Fc receptors on inflammatory cells may be minimized. It may be important, however, to maintain proper stacking and other three-dimensional structural interactions between the various immunoglobulin domains of the fusion protein. Thus, embodiments of the fusion proteins of the present invention may

5 substitute the biologically inert, but structurally similar RAGE interdomain linker that separates the V and C1 domains of RAGE, or the linker that separates the C1 and C2 domains of RAGE, in lieu of the normal hinge region of the immunoglobulin heavy chain. Thus, the RAGE polypeptide of the fusion protein may comprise an interdomain linker sequence that is naturally found downstream of a RAGE immunoglobulin domain to form a RAGE immunoglobulin domain/linker fragment. In this way, the three dimensional interactions between the immunoglobulin domains contributed by either RAGE or the immunoglobulin may be maintained.

10 In an embodiment, a RAGE fusion protein of the present invention may comprise a substantial increase in pharmacokinetic stability as compared to sRAGE. For example, FIG. 11 shows that once the RAGE fusion protein TTP-4000 has saturated its ligands, it may retain a half-life of greater than 300 hours. This may be contrasted with the half-life for sRAGE of only a few hours in human plasma.

15 Thus, in an embodiment, the RAGE fusion proteins of the present invention may be used to antagonize binding of physiological ligands to RAGE as a means to treat RAGE-mediated diseases without generating an unacceptable amount of inflammation. The fusion proteins of the present invention may exhibit a substantial decrease in generating a proinflammatory response as compared to IgG. For example, as shown in FIG. 12, the RAGE fusion protein TTP-4000 does not stimulate TNF- α release from cells under conditions where human IgG stimulation of TNF- α release is detected.

Treatment of Disease with RAGE Fusion Proteins

20 The present invention may also comprise methods for the treatment of RAGE-mediated disorder in a human subject. In an embodiment, the method may comprise administering to a subject a fusion protein comprising a RAGE polypeptide comprising a RAGE ligand binding site linked to a second, non-RAGE polypeptide. In one embodiment, the fusion protein may comprise a RAGE ligand binding site. In an embodiment, the ligand binding site comprises the most N-terminal domain of the fusion protein. The RAGE ligand binding site may comprise the V domain of RAGE, or a portion thereof. In an embodiment, the RAGE ligand binding site comprises SEQ ID NO: 9 or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10 or a sequence 90% identical thereto.

30 In an embodiment, the RAGE polypeptide may be linked to a polypeptide comprising an immunoglobulin domain or a portion (e.g., a fragment thereof) of an immunoglobulin

domain. In one embodiment, the polypeptide comprising an immunoglobulin domain comprises at least a portion of at least one of the C_H2 or the C_H3 domains of a human IgG. 57

The RAGE protein or polypeptide may comprise full-length human RAGE (e.g., SEQ ID NO: 1), or a fragment of human RAGE. In an embodiment, the RAGE polypeptide does not include any signal sequence residues. The signal sequence of RAGE may comprise either residues 1-22 or residues 1-23 of full length RAGE (SEQ ID NO: 1). In alternate embodiments, the RAGE polypeptide may comprise a sequence that is 70%, 80% or 90% identical to human RAGE, or a fragment thereof. For example, in one embodiment, the RAGE polypeptide may comprise human RAGE, or a fragment thereof, with Glycine as the first residue rather than a Methionine (see e.g., Neeper *et al.*, (1992)). Or, the human RAGE may comprise full-length RAGE with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 3) (FIGS. 1A and 1B) or a portion of that amino acid sequence. The fusion proteins of the present invention may also comprise sRAGE (e.g., SEQ ID NO: 4), a polypeptide 90% identical to sRAGE, or a fragment of sRAGE. For example, the RAGE polypeptide may comprise human sRAGE, or a fragment thereof, with Glycine as the first residue rather than a Methionine (see e.g., Neeper *et al.*, (1992)). Or, the human RAGE may comprise sRAGE with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6) (FIG. 1C) or a portion of that amino acid sequence. In other embodiments, the RAGE protein may comprise a V domain (e.g., SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 8; FIG. 1D). Or, a sequence 90% identical to the V domain or a fragment thereof may be used. Or, the RAGE protein may comprise a fragment of RAGE comprising a portion of the V domain (e.g., SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 10, FIG. 1D). In an embodiment, the ligand binding site may comprise SEQ ID NO: 9, or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10, or a sequence 90% identical thereto. In yet another embodiment, the RAGE fragment is a synthetic peptide.

The fusion protein may include several types of peptides that are not derived from RAGE or a fragment thereof. The second polypeptide of the fusion protein may comprise a polypeptide derived from an immunoglobulin. The heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain isotypes: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ), or IgA (α). In addition, the heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain subtypes: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), or mutations of these isotypes or subtypes that alter the biological activity. The second polypeptide may comprise the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion of either, or both, of these domains. As an example embodiments, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion thereof may comprise SEQ ID NO:

38 or SEQ ID NO: 40. The immunoglobulin peptide may be encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 39 or SEQ ID NO: 41.

58

For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-116 of human RAGE (SEQ ID NO: 7) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-116 of human RAGE (SEQ ID NO: 8) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V domain of RAGE. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 124-221 of human RAGE (SEQ ID NO: 11) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the C1 domain of RAGE. In another embodiment, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 227-317 of human RAGE (SEQ ID NO: 12) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the C2 domain of RAGE. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-123 of human RAGE (SEQ ID NO: 13) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-123 of human RAGE (SEQ ID NO: 14) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V domain of RAGE and a downstream interdomain linker. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-226 of human RAGE (SEQ ID NO: 17) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-226 of human RAGE (SEQ ID NO: 18) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V-domain, the C1 domain and the interdomain linker linking these two domains. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-339 of human RAGE (SEQ ID NO: 5) or a sequence 90% identical thereto, or 24-339 of human RAGE (SEQ ID NO: 6) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to sRAGE (i.e., encoding the V, C1, and C2 domains and interdomain linkers). Or, fragments of each of these sequences may be used.

The Fc portion of the immunoglobulin chain may be proinflammatory *in vivo*. Thus, in one embodiment, the RAGE fusion protein of the present invention comprises an interdomain linker derived from RAGE rather than an interdomain hinge polypeptide derived from an immunoglobulin.

Thus in one embodiment, the fusion protein may further comprise a RAGE polypeptide directly linked to a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a fragment thereof. In one embodiment, the C_H2 domain, or a fragment thereof comprises SEQ ID NO: 42.

In one embodiment, the RAGE polypeptide comprises a RAGE interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain such that the C-terminal amino acid of the RAGE immunoglobulin domain is linked to the N-terminal amino acid of the interdomain linker, and the C-terminal amino acid of the RAGE interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a

fragment thereof. The polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin may comprise the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1. As an example embodiment, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 may comprise SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 40.

59

5 The fusion protein of the present invention may comprise a single or multiple domains from RAGE. Also, the RAGE polypeptide comprising an interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain may comprise a fragment of a full-length RAGE protein. For example, in one embodiment, the fusion protein may comprise two immunoglobulin domains derived from RAGE protein and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. The fusion protein may comprise a first RAGE immunoglobulin domain and a first interdomain linker linked to a second RAGE immunoglobulin domain and a second RAGE interdomain linker, such that the N-terminal amino acid of the first interdomain linker is linked to the C-terminal amino acid of the first RAGE immunoglobulin domain, the N-terminal amino acid of the second RAGE immunoglobulin domain is linked to C-terminal amino acid of the first interdomain linker, the N-terminal amino acid of the second interdomain linker is linked to C-terminal amino acid of the RAGE second immunoglobulin domain, and the C-terminal amino acid of the RAGE second interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of the polypeptide comprising a C_H2 immunoglobulin domain or fragment thereof. For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-251 of human RAGE (SEQ ID NO: 19) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-251 of human RAGE (SEQ ID NO: 20) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V-domain, the C1 domain, the interdomain linker linking these two domains, and a second interdomain linker downstream of C1. In one embodiment, a nucleic acid construct comprising SEQ ID NO: 30 or a fragment thereof may encode for a four domain RAGE fusion protein.

Alternatively, a three domain fusion protein may comprise one immunoglobulin domain derived from RAGE and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. For example, the fusion protein may comprise a single RAGE immunoglobulin domain linked via a RAGE interdomain linker to the N-terminal amino acid of the polypeptide comprising a C_H2 immunoglobulin domain or a fragment thereof. For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-136 of human RAGE (SEQ ID NO: 15) or a sequence 90% identical thereto or amino acids 24-136 of human RAGE (SEQ ID NO: 16) or a sequence 90% identical thereto corresponding to the V domain of RAGE and a

downstream interdomain linker. In one embodiment, a nucleic acid construct comprising SEQ ID NO: 31 or a fragment thereof may encode for a three domain RAGE fusion protein. 60

A RAGE interdomain linker fragment may comprise a peptide sequence that is naturally downstream of, and thus, linked to, a RAGE immunoglobulin domain. For example, for the RAGE V domain, the interdomain linker may comprise amino acid sequences that are naturally downstream from the V domain. In an embodiment, the linker may comprise SEQ ID NO: 21, corresponding to amino acids 117-123 of full-length RAGE. Or, the linker may comprise a peptide having additional portions of the natural RAGE sequence. For example, a interdomain linker comprising several amino acids (e.g., 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids) upstream and downstream of SEQ ID NO: 21 may be used. Thus, in one embodiment, the interdomain linker comprises SEQ ID NO: 23 comprising amino acids 117-136 of full-length RAGE. Or, fragments of SEQ ID NO: 21 deleting, for example, 1, 2, or 3, amino acids from either end of the linker may be used. In alternate embodiments, the linker may comprise a sequence that is 70% identical, or 80% identical, or 90% identical to SEQ ID NO: 21 or SEQ ID NO: 23.

For the RAGE C1 domain, the linker may comprise peptide sequence that is naturally downstream of the C1 domain. In an embodiment, the linker may comprise SEQ ID NO: 22, corresponding to amino acids 222-251 of full-length RAGE. Or, the linker may comprise a peptide having additional portions of the natural RAGE sequence. For example, a linker comprising several (1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids) amino acids upstream and downstream of SEQ ID NO: 22 may be used. Or, fragments of SEQ ID NO: 22 may be used, deleting for example, 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids from either end of the linker. For example, in one embodiment, a RAGE interdomain linker may comprise SEQ ID NO: 24, corresponding to amino acids 222-226. Or an interdomain linker may comprise SEQ ID NO: 44, corresponding to RAGE amino acids 318-342.

In an embodiment, a fusion protein of the present invention may be administered by various routes. Administration of the RAGE fusion protein of the present invention may employ intraperitoneal (IP) injection. Alternatively, the RAGE fusion protein may be administered orally, intranasally, or as an aerosol. In another embodiment, administration is intravenous (IV). The RAGE fusion protein may also be injected subcutaneously. In another embodiment, administration of the fusion protein is intra-arterial. In another embodiment, administration is sublingual. Also, administration may employ a time-release capsule. In yet another embodiment, administration may be transrectal, as by a suppository or the like. For

example, subcutaneous administration may be useful to treat chronic disorders when the self-administration is desirable. 61

A variety of animal models have been used to validate the use of compounds that modulate RAGE as therapeutics. Examples of these models are as follows:

- 5 a) sRAGE inhibited neointimal formation in a rat model of restenosis following arterial injury in both diabetic and normal rats by inhibiting endothelial, smooth muscle and macrophage activation via RAGE (Zhou *et al.*, *Circulation* 107:2238-2243 (2003));
- 10 b) Inhibition of RAGE/ligand interactions, using either sRAGE or an anti-RAGE antibody, reduced amyloid plaque formation in a mouse model of systemic amyloidosis (Yan *et al.*, *Nat. Med.*, 6:643-651 (2000)). Accompanying the reduction in amyloid plaques was a reduction in the inflammatory cytokines, interleukin-6 (IL-6) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) as well as reduced activation of NF- κ B in the treated animals;
- 15 c) RAGE transgenic mice (RAGE overexpressers and RAGE dominant negative expressers) exhibit plaque formation and cognitive deficits in a mouse model of AD (Arancio *et al.*, *EMBO J.*, 23:4096-4105 (2004));
- d) Treatment of diabetic rats with sRAGE reduced vascular permeability (Bonnardel-Phu *et al.*, *Diabetes*, 48:2052-2058 (1999));
- 20 e) Treatment with sRAGE reduced atherosclerotic lesions in diabetic apolipoprotein E-null mice and prevented the functional and morphological indices of diabetic nephropathy in db/db mice (Hudson *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 419:80-88 (2003)); and
- 25 f) sRAGE attenuated the severity of inflammation in a mouse model of collagen-induced arthritis (Hofmann *et al.*, *Genes Immunol.*, 3:123-135 (2002)), a mouse model of experimental allergic encephalomyelitis (Yan *et al.*, *Nat. Med.* 9:28-293 (2003)) and a mouse model of inflammatory bowel disease (Hofmann *et al.*, *Cell*, 97:889-901 (1999)).

Thus, in an embodiment, the fusion proteins of the present invention may be used to treat a symptom of diabetes and/or complications resulting from diabetes mediated by RAGE.

- 30 In alternate embodiments, the symptom of diabetes or diabetic late complications may comprise diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, a diabetic foot ulcer, a cardiovascular complication of diabetes, or diabetic neuropathy.

Originally identified as a receptor for molecules whose expression is associated with the pathology of diabetes, RAGE itself is essential to the pathophysiology of diabetic

62

complications. *In vivo*, inhibition of RAGE interaction with its ligand(s) has been shown to be therapeutic in multiple models of diabetic complications and inflammation (Hudson et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 419:80-88 (2003)). For example, a two-month treatment with anti-RAGE antibodies normalized kidney function and reduced abnormal kidney histopathology in diabetic mice (Flyvbjerg et al., *Diabetes* 53:166-172 (2004)). Furthermore, treatment with a soluble form of RAGE (sRAGE) which binds to RAGE ligands and inhibits RAGE/ligand interactions, reduced atherosclerotic lesions in diabetic apolipoprotein E-null mice and attenuated the functional and morphological pathology of diabetic nephropathy in db/db mice (Bucciarelli et al., *Circulation* 106:2827-2835 (2002)).

Also, it has been shown that nonenzymatic glycoxidation of macromolecules ultimately resulting in the formation of advanced glycation endproducts (AGEs) is enhanced at sites of inflammation, in renal failure, in the presence of hyperglycemia and other conditions associated with systemic or local oxidant stress (Dyer et al., *J. Clin. Invest.*, 91:2463-2469 (1993); Reddy et al., *Biochem.*, 34:10872-10878 (1995); Dyer et al., *J. Biol. Chem.*, 266:11654-11660 (1991); Degenhardt et al., *Cell Mol. Biol.*, 44:1139-1145 (1998)). Accumulation of AGEs in the vasculature can occur focally, as in the joint amyloid composed of AGE- β_2 -microglobulin found in patients with dialysis-related amyloidosis (Miyata et al., *J. Clin. Invest.*, 92:1243-1252 (1993); Miyata et al., *J. Clin. Invest.*, 98:1088-1094 (1996)), or generally, as exemplified by the vasculature and tissues of patients with diabetes (Schmidt et al., *Nature Med.*, 1:1002-1004 (1995)). The progressive accumulation of AGEs over time in patients with diabetes suggests that endogenous clearance mechanisms are not able to function effectively at sites of AGE deposition. Such accumulated AGEs have the capacity to alter cellular properties by a number of mechanisms. Although RAGE is expressed at low levels in normal tissues and vasculature, in an environment where the receptor's ligands accumulate, it has been shown that RAGE becomes upregulated (Li et al., *J. Biol. Chem.*, 272:16498-16506 (1997); Li et al., *J. Biol. Chem.*, 273:30870-30878 (1998); Tanaka et al., *J. Biol. Chem.*, 275:25781-25790 (2000)). RAGE expression is increased in endothelium, smooth muscle cells and infiltrating mononuclear phagocytes in diabetic vasculature. Also, studies in cell culture have demonstrated that AGE-RAGE interaction causes changes in cellular properties important in vascular homeostasis.

Use of the RAGE fusion proteins in the treatment of diabetes related pathology is illustrated in FIG. 13. The RAGE fusion protein TTP-4000 was evaluated in a diabetic rat model of restenosis which involved measuring smooth muscle proliferation and intimal expansion following vascular injury. As illustrated in FIG. 13, TTP-4000 treatment may

significantly reduce the intima/media (I/M) ratio (FIG. 13A; Table 1) in diabetes-associated restenosis in a dose-responsive manner. Also, TTP-4000 treatment may significantly reduce restenosis-associated vascular smooth muscle cell proliferation in a dose-responsive manner.

Table 1

63

Effect of TTP-4000 in Rat Model of Restenosis

	IgG (n=9)	TTP-4000 (n=9) Low dose** (0.3 mg/animal qod x 4)	TTP-4000 (n=9) High dose** (1.0 mg/animal qod x 4)
Luminal area (mm ²)	0.2 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.16 ± 0.02
Medial area (mm ²)	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01
I/M ratio	1.71 ± 0.27	1.61 ± 0.26	1.44* ± 0.15

*P<0.05

**** For both high and low dose, a loading dose of 3 mg/animal was used.**

In other embodiments, the fusion proteins of the present invention may also be used to treat or reverse amyloidoses and Alzheimer's disease. RAGE is a receptor for amyloid beta (A β) as well as other amyloidogenic proteins including SAA and amylin (Yan *et al.*, *Nature*, 382:685-691 (1996); Yan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94:5296-5301 (1997); Yan *et al.*, *Nat. Med.*, 6:643-651 (2000); Sousa *et al.*, *Lab Invest.*, 80:1101-1110 (2000)). Also, the RAGE ligands, including AGEs, S100b and A β proteins, are found in tissue surrounding the senile plaque in man (Luth *et al.*, *Cereb. Cortex* 15:211-220 (2005); Petzold *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 336:167-170 (2003); Sasaki *et al.*, *Brain Res.*, 12:256-262 (2001; Yan *et al.*, *Restor. Neurol Neuosci.*, 12:167-173 (1998)). It has been shown that RAGE binds β -sheet fibrillar material regardless of the composition of the subunits (amyloid- β peptide, amylin, serum amyloid A, prion-derived peptide) (Yan *et al.*, *Nature*, 382:685-691 (1996); Yan *et al.*, *Nat. Med.*, 6:643-651 (2000)). In addition, deposition of amyloid has been shown to result in enhanced expression of RAGE. For example, in the brains of patients with Alzheimer's disease (AD), RAGE expression increases in neurons and glia (Yan, *et al.*, *Nature* 382:685-691 (1996)). Concurrent with expression of RAGE ligands, RAGE is upregulated in astrocytes and microglial cells in the hippocampus of individuals with AD but is not upregulated in individuals that do not have AD (Lue *et al.*, *Exp. Neurol.*, 171:29-45 (2001)). These findings suggest that cells expressing RAGE are activated via RAGE/RAGE ligand

interactions in the vicinity of the senile plaque. Also, *in vitro*, A β -mediated activation of microglial cells can be blocked with antibodies directed against the ligand-binding domain of RAGE (Yan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94:5296-5301 (1997)). It has also been demonstrated that RAGE can serve as a focal point for fibril assembly (Deane et al., *Nat. Med.* 9:907-913 (2003)).

Also, *in vivo* inhibition of RAGE/ligand interactions using either sRAGE or an anti-RAGE antibody can reduce amyloid plaque formation in a mouse model of systemic amyloidosis (Yan et al., *Nat. Med.*, 6:643-651 (2000)). Double transgenic mice that over-express human RAGE and human amyloid precursor protein (APP) with the Swedish and London mutations (mutant hAPP) in neurons develop learning defects and neuropathological abnormalities earlier than their single mutant hAPP transgenic counterparts. In contrast, double transgenic mice with diminished A β signaling capacity due to neurons expressing a dominant negative form of RAGE on the same mutant hAPP background, show a delayed onset of neuropathological and learning abnormalities compared to their single APP transgenic counterpart (Arancio et al., *EMBO J.*, 23:4096-4105 (2004)).

In addition, inhibition of RAGE-amyloid interaction has been shown to decrease expression of cellular RAGE and cell stress markers (as well as NF- κ B activation), and diminish amyloid deposition (Yan et al., *Nat. Med.*, 6:643-651 (2000)) suggesting a role for RAGE-amyloid interaction in both perturbation of cellular properties in an environment enriched for amyloid (even at early stages) as well as in amyloid accumulation.

Thus, the RAGE fusion proteins of the present invention may also be used to treat reduce amyloidosis and to reduce amyloid plaques and cognitive dysfunction associated with Alzheimer's Disease (AD). As described above, sRAGE has been shown to reduce both amyloid plaque formation in the brain and subsequent increase in inflammatory markers in an animal model of AD. FIGS. 14A and 14B show that mice that have AD, and are treated for 3 months with either TTP-4000 or mouse sRAGE had fewer amyloid beta (A β) plaques and less cognitive dysfunction than animals that received a vehicle or a human IgG negative control (IgG1). Like sRAGE, TTP-4000 may also reduce the inflammatory cytokines IL-1 and TNF- α (data not shown) associated with AD.

Also, fusion proteins of the present invention may be used to treat atherosclerosis and other cardiovascular disorders. Thus, it has been shown that ischemic heart disease is particularly high in patients with diabetes (Robertson, et al., *Lab Invest.*, 18:538-551 (1968); Kannel et al., *J. Am. Med. Assoc.*, 241:2035-2038 (1979); Kannel et al., *Diab. Care*, 2:120-

126 (1979)). In addition, studies have shown that atherosclerosis in patients with diabetes is more accelerated and extensive than in patients not suffering from diabetes (see e.g. Waller *et al.*, *Am. J. Med.*, 69:498-506 (1980); Crall *et al.*, *Am. J. Med.* 64:221-230 (1978); Hamby *et al.*, *Chest*, 2:251-257 (1976); and Pyorala *et al.*, *Diab. Metab. Rev.*, 3:463-524 (1978)).

65

5 Although the reasons for accelerated atherosclerosis in the setting of diabetes are many, it has been shown that reduction of AGEs can reduce plaque formation.

For example, the RAGE fusion proteins of the present invention may also be used to treat stroke. When TTP-4000 was compared to sRAGE in a disease relevant animal model of stroke, TTP-4000 was found to provide a significantly greater reduction in infarct volume.

10 In this model, the middle carotid artery of a mouse is ligated and then reperfused to form an infarct. To assess the efficacy of RAGE fusion proteins to treat or prevent stroke, mice were treated with sRAGE or TTP-4000 or control immunoglobulin just prior to reperfusion. As can be seen in Table 2, TTP-4000 was more efficacious than sRAGE in limiting the area of infarct in these animals suggesting that TTP-4000, because of its better half-life in plasma,
5 was able to maintain greater protection than sRAGE.

Table 2
Reduction of Infarct in Stroke

	% Reduction of Infarct**
sRAGE	15%*
TTP-4000 (300 µg)	38%*
TTP-4000 (300 µg)	21%*
TTP-4000 (300 µg)	10%*
IgG Isotype control (300 µg)	4%

*Significant to $p < 0.001$; **Compared to saline

In another embodiment, the fusion proteins of the present invention may be used to
20 treat cancer. In one embodiment, the cancer treated using the fusion proteins of the present invention comprises cancer cells that express RAGE. For example, cancers that may be treated with the RAGE fusion protein of the present invention include some lung cancers, some gliomas, some papillomas, and the like. Amphoterin is a high mobility group I nonhistone chromosomal DNA binding protein (Rauvala *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262:16625-
25 16635 (1987); Parkikinen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:19726-19738 (1993)) which has been shown to interact with RAGE. It has been shown that amphoterin promotes neurite outgrowth, as well as serving as a surface for assembly of protease complexes in the

66

fibrinolytic system (also known to contribute to cell mobility). In addition, a local tumor growth inhibitory effect of blocking RAGE has been observed in a primary tumor model (C6 glioma), the Lewis lung metastasis model (Taguchi *et al.*, *Nature* 405:354-360 (2000)), and spontaneously arising papillomas in mice expressing the v-Ha-ras transgene (Leder *et al.*,
5 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9178-9182 (1990)).

In yet another embodiment, fusion proteins of the present invention may be used to treat inflammation. For example, in alternate embodiments, the fusion protein of the present invention is used to treat inflammation associated with autoimmunity, inflammation associated with inflammatory bowel disease, inflammation associated with rheumatoid
10 arthritis, inflammation associated with psoriasis, inflammation associated with multiple sclerosis, inflammation associated with hypoxia, inflammation associated with stroke, inflammation associated with heart attack, inflammation associated with hemorrhagic shock, inflammation associated with sepsis, inflammation associated with organ transplantation, or inflammation associated with impaired wound healing.

For example, following thrombolytic treatment, inflammatory cells such as granulocytes infiltrate the ischemic tissue and produce oxygen radicals that can destroy more cells than were killed by the hypoxia. Inhibiting the receptor on the neutrophil responsible for the neutrophils being able to infiltrate the tissue with antibodies or other protein antagonists has been shown to ameliorate the response. Since RAGE is a ligand for this
15 neutrophil receptor, a fusion protein containing a fragment of RAGE may act as a decoy and prevent the neutrophil from trafficking to the reperfused site and thus prevent further tissue destruction. The role of RAGE in prevention of inflammation may be indicated by studies showing that sRAGE inhibited neointimal expansion in a rat model of restenosis following arterial injury in both diabetic and normal rats, presumably by inhibiting endothelial, smooth
20 muscle cell proliferation and macrophage activation via RAGE (Zhou *et al.*, *Circulation*, 107:2238-2243 (2003)). In addition, sRAGE inhibited models of inflammation including delayed-type hypersensitivity, experimental autoimmune encephalitis and inflammatory bowel disease (Hofman *et al.*, *Cell*, 97:889-901 (1999)).
25

Also, in an embodiment, the fusion proteins of the present invention may be used to
30 treat auto-immune based disorders. For example, the fusion proteins of the present invention may be used to treat kidney failure. Thus, the fusion proteins of the present invention may be used to treat systemic lupus nephritis or inflammatory lupus nephritis. For example, the S100/calgranulins have been shown to comprise a family of closely related calcium-binding polypeptides characterized by two EF-hand regions linked by a connecting peptide (Schafer

et al., *TIBS*, 21:134-140 (1996); Zimmer *et al.*, *Brain Res. Bull.*, 37:417-429 (1995); Rammes *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:9496-9502 (1997); Luger *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.*, 25:659-664 (1995)). Although they lack signal peptides, it has long been known that S100/calgranulins gain access to the extracellular space, especially at sites of chronic immune/inflammatory responses, as in cystic fibrosis and rheumatoid arthritis. RAGE is a receptor for many members of the S100/calgranulin family, mediating their proinflammatory effects on cells such as lymphocytes and mononuclear phagocytes. Also, studies on delayed-type hypersensitivity response, colitis in IL-10 null mice, collagen-induced arthritis, and experimental autoimmune encephalitis models suggest that RAGE-ligand interaction (presumably with S-100/calgranulins) has a proximal role in the inflammatory cascade.

Thus, in various selected embodiments, the present invention may provide a method for inhibiting the interaction of an AGE with RAGE in a subject by administering to the subject a therapeutically effective amount of a fusion protein of the present invention. The subject treated using the RAGE fusion proteins of the present invention may be an animal. In an embodiment, the subject is a human. The subject may be suffering from an AGE-related disease such as diabetes, diabetic complications such as nephropathy, neuropathy, retinopathy, foot ulcer, amyloidoses, or renal failure, and inflammation. Or, the subject may be an individual with Alzheimer's disease. In an alternative embodiment, the subject may be an individual with cancer. In yet other embodiments, the subject may be suffering from systemic lupus erythematosus or inflammatory lupus nephritis. Other diseases may be mediated by RAGE and thus, may be treated using the fusion proteins of the present invention. Thus, in additional alternative embodiments of the present invention, the fusion proteins may be used for treatment of Crohn's disease, arthritis, vasculitis, nephropathies, retinopathies, and neuropathies in human or animal subjects.

A therapeutically effective amount may comprise an amount which is capable of preventing the interaction of RAGE with an AGE or other types of endogenous RAGE ligands in a subject. Accordingly, the amount will vary with the subject being treated. Administration of the compound may be hourly, daily, weekly, monthly, yearly, or as a single event. In various alternative embodiments, the effective amount of the fusion protein may range from about 1 ng/kg body weight to about 100 mg/kg body weight, or from about 10 µg/kg body weight to about 50 mg/kg body weight, or from about 100 µg/kg body weight to about 10 mg/kg body weight. The actual effective amount may be established by dose/response assays using methods standard in the art (Johnson *et al.*, *Diabetes*. 42: 1179,

(1993)). Thus, as is known to those in the art, the effective amount may depend on bioavailability, bioactivity, and biodegradability of the compound.

Compositions

The present invention may comprise a composition comprising a fusion protein of the present invention mixed with a pharmaceutically acceptable carrier. The fusion protein may comprise a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide. In one embodiment, the fusion protein may comprise a RAGE ligand binding site. In an embodiment, the ligand binding site comprises the most N-terminal domain of the fusion protein. The RAGE ligand binding site may comprise the V domain of RAGE, or a portion thereof. In an embodiment, the RAGE ligand binding site comprises SEQ ID NO: 9 or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10 or a sequence 90% identical thereto.

In an embodiment, the RAGE polypeptide may be linked to a polypeptide comprising an immunoglobulin domain or a portion (e.g., a fragment thereof) of an immunoglobulin domain. In one embodiment, the the polypeptide comprising an immunoglobulin domain comprises at least a portion of at least one of the C_H2 or the C_H3 domains of a human IgG.

The RAGE protein or polypeptide may comprise full-length human RAGE (e.g., SEQ ID NO: 1), or a fragment of human RAGE. In an embodiment, the RAGE polypeptide does not include any signal sequence residues. The signal sequence of RAGE may comprise either residues 1-22 or residues 1-23 of full length RAGE (SEQ ID NO: 1). In alternate embodiments, the RAGE polypeptide may comprise a sequence that is 70%, 80% or 90% identical to human RAGE, or a fragment thereof. For example, in one embodiment, the RAGE polypeptide may comprise human RAGE, or a fragment thereof, with Glycine as the first residue rather than a Methionine (see e.g., Neeper *et al.*, (1992)). Or, the human RAGE may comprise full-length RAGE with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 3) (FIGS. 1A and 1B) or a portion of that amino acid sequence. The fusion proteins of the present invention may also comprise sRAGE (e.g., SEQ ID NO: 4), a polypeptide 90% identical to sRAGE, or a fragment of sRAGE. For example, the RAGE polypeptide may comprise human sRAGE, or a fragment thereof, with Glycine as the first residue rather than a Methionine (see e.g., Neeper *et al.*, (1992)). Or, the human RAGE may comprise sRAGE with the signal sequence removed (e.g., SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6) (FIG. 1C) or a portion of that amino acid sequence. In other embodiments, the RAGE protein may comprise a V domain (e.g., SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 8; FIG. 1D). Or, a sequence 90% identical to the V domain or a fragment thereof may be used. Or, the RAGE protein may comprise a fragment of RAGE comprising a portion of the V domain (e.g., SEQ ID NO:

9 or SEQ ID NO: 10, FIG. 1D). In an embodiment, the ligand binding site may comprise SEQ ID NO: 9, or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10, or a sequence 90% identical thereto. In yet another embodiment, the RAGE fragment is a synthetic peptide. 69

For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-116 of human RAGE (SEQ ID NO: 7) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-116 of human RAGE (SEQ ID NO: 8) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V domain of RAGE. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 124-221 of human RAGE (SEQ ID NO: 11) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the C1 domain of RAGE. In another embodiment, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 227-317 of human RAGE (SEQ ID NO: 12) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the C2 domain of RAGE. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-123 of human RAGE (SEQ ID NO: 13) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-123 of human RAGE (SEQ ID NO: 14) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V domain of RAGE and a downstream interdomain linker. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-226 of human RAGE (SEQ ID NO: 17) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-226 of human RAGE (SEQ ID NO: 18) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to the V-domain, the C1 domain and the interdomain linker linking these two domains. Or, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-339 of human RAGE (SEQ ID NO: 5) or a sequence 90% identical thereto, or 24-339 of human RAGE (SEQ ID NO: 6) or a sequence 90% identical thereto, corresponding to sRAGE (i.e., encoding the V, C1, and C2 domains and interdomain linkers). Or, fragments of each of these sequences may be used.

The fusion protein may include several types of peptides that are not derived from RAGE or a fragment thereof. The second polypeptide of the fusion protein may comprise a polypeptide derived from an immunoglobulin. The heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain isotypes: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ), or IgA (α). In addition, the heavy chain (or portion thereof) may be derived from any one of the known heavy chain subtypes: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), or mutations of these isotypes or subtypes that alter the biological activity. The second polypeptide may comprise the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion of either, or both, of these domains. As an example embodiments, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 or a portion thereof may comprise SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 40. The immunoglobulin peptide may be encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 39 or SEQ ID NO: 41.

The Fc portion of the immunoglobulin chain may be proinflammatory *in vivo*. Thus, in one embodiment, the RAGE fusion protein of the present invention comprises an interdomain linker derived from RAGE rather than an interdomain hinge polypeptide derived from an immunoglobulin.

70

Thus in one embodiment, the fusion protein may further comprise a RAGE polypeptide directly linked to a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a fragment thereof. In one embodiment, the C_H2 domain, or a fragment thereof comprises SEQ ID NO: 42.

In one embodiment, the RAGE polypeptide comprises a RAGE interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain such that the C-terminal amino acid of the RAGE immunoglobulin domain is linked to the N-terminal amino acid of the interdomain linker, and the C-terminal amino acid of the RAGE interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of a polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a fragment thereof. The polypeptide comprising a C_H2 domain of an immunoglobulin, or a portion thereof, may comprise the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1. As an example embodiment, the polypeptide comprising the C_H2 and C_H3 domains of a human IgG1 may comprise SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 40.

The fusion protein of the present invention may comprise a single or multiple domains from RAGE. Also, the RAGE polypeptide comprising an interdomain linker linked to a RAGE immunoglobulin domain may comprise a fragment of a full-length RAGE protein. For example, in one embodiment, the fusion protein may comprise two immunoglobulin domains derived from RAGE protein and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. The fusion protein may comprise a first RAGE immunoglobulin domain and a first interdomain linker linked to a second RAGE immunoglobulin domain and a second RAGE interdomain linker, such that the N-terminal amino acid of the first interdomain linker is linked to the C-terminal amino acid of the first RAGE immunoglobulin domain, the N-terminal amino acid of the second RAGE immunoglobulin domain is linked to C-terminal amino acid of the first interdomain linker, the N-terminal amino acid of the second interdomain linker is linked to C-terminal amino acid of the RAGE second immunoglobulin domain, and the C-terminal amino acid of the RAGE second interdomain linker is directly linked to the N-terminal amino acid of the polypeptide comprising a C_H2 immunoglobulin domain or fragment thereof. For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-251 of human RAGE (SEQ ID NO: 19) or a sequence 90% identical thereto, or amino acids 24-251 of human RAGE (SEQ ID NO: 20) or a sequence

90% identical thereto, corresponding to the V-domain, the C1 domain, the interdomain linker linking these two domains, and a second interdomain linker downstream of C1. In one embodiment, a nucleic acid construct comprising SEQ ID NO: 30 or a fragment thereof may encode for a four domain RAGE fusion protein.

71

Alternatively, a three domain fusion protein may comprise one immunoglobulin domain derived from RAGE and two immunoglobulin domains derived from a human Fc polypeptide. For example, the fusion protein may comprise a single RAGE immunoglobulin domain linked via a RAGE interdomain linker to the N-terminal amino acid of the polypeptide comprising a C_H2 immunoglobulin domain or a fragment thereof. For example, the RAGE polypeptide may comprise amino acids 23-136 of human RAGE (SEQ ID NO: 15) or a sequence 90% identical thereto or amino acids 24-136 of human RAGE (SEQ ID NO: 16) or a sequence 90% identical thereto corresponding to the V domain of RAGE and a downstream interdomain linker. In one embodiment, a nucleic acid construct comprising SEQ ID NO: 31 or a fragment thereof may encode for a three domain RAGE fusion protein.

A RAGE interdomain linker fragment may comprise a peptide sequence that is naturally downstream of, and thus, linked to, a RAGE immunoglobulin domain. For example, for the RAGE V domain, the interdomain linker may comprise amino acid sequences that are naturally downstream from the V domain. In an embodiment, the linker may comprise SEQ ID NO: 21, corresponding to amino acids 117-123 of full-length RAGE. Or, the linker may comprise a peptide having additional portions of the natural RAGE sequence. For example, a interdomain linker comprising several amino acids (e.g., 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids) upstream and downstream of SEQ ID NO: 21 may be used. Thus, in one embodiment, the interdomain linker comprises SEQ ID NO: 23 comprising amino acids 117-136 of full-length RAGE. Or, fragments of SEQ ID NO: 21 deleting, for example, 1, 2, or 3, amino acids from either end of the linker may be used. In alternate embodiments, the linker may comprise a sequence that is 70% identical, or 80% identical, or 90% identical to SEQ ID NO: 21 or SEQ ID NO: 23.

For the RAGE C1 domain, the linker may comprise peptide sequence that is naturally downstream of the C1 domain. In an embodiment, the linker may comprise SEQ ID NO: 22, corresponding to amino acids 222-251 of full-length RAGE. Or, the linker may comprise a peptide having additional portions of the natural RAGE sequence. For example, a linker comprising several (1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids) amino acids upstream and downstream of SEQ ID NO: 22 may be used. Or, fragments of SEQ ID NO: 22 may be used, deleting for example, 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-15 amino acids from either end of the linker. For

example, in one embodiment, a RAGE interdomain linker may comprise SEQ ID NO: 24, corresponding to amino acids 222-226. Or an interdomain linker may comprise SEQ ID NO: 44, corresponding to RAGE amino acids 318-342.

72

Pharmaceutically acceptable carriers may comprise any of the standard
5 pharmaceutically accepted carriers known in the art. The carrier may comprise a diluent. In one embodiment, the pharmaceutical carrier may be a liquid and the fusion protein or nucleic acid construct may be in the form of a solution. In another embodiment, the
10 pharmaceutically acceptable carrier may be a solid in the form of a powder, a lyophilized powder, or a tablet. Or, the pharmaceutical carrier may be a gel, suppository, or cream. In alternate embodiments, the carrier may comprise a liposome, a microcapsule, a polymer encapsulated cell, or a virus. Thus, the term pharmaceutically acceptable carrier encompasses, but is not limited to, any of the standard pharmaceutically accepted carriers, such as water, alcohols, phosphate buffered saline solution, sugars (e.g., sucrose or mannitol), oils or emulsions such as oil/water emulsions or a triglyceride emulsion, various types of
15 wetting agents, tablets, coated tablets and capsules.

Administration of the RAGE fusion proteins of the present invention may employ various routes. Thus, administration of the RAGE fusion protein of the present invention may employ intraperitoneal (IP) injection. Alternatively, the RAGE fusion protein may be administered orally, intranasally, or as an aerosol. In another embodiment, administration is
20 intravenous (IV). The RAGE fusion protein may also be injected subcutaneously. In another embodiment, administration of the fusion protein is intra-arterial. In another embodiment, administration is sublingual. Also, administration may employ a time-release capsule. In yet another embodiment, administration may be transrectal, as by a suppository or the like. For example, subcutaneous administration may be useful to treat chronic disorders when the self-
25 administration is desirable.

The pharmaceutical compositions may be in the form of a sterile injectable solution in a non-toxic parenterally acceptable solvent or vehicle. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer's solution, 3-butanediol, isotonic sodium chloride solution, or aqueous buffers, as for example, physiologically acceptable citrate, acetate, glycine, histidine, phosphate, tris or succinate buffers. The injectable solution may
30 contain stabilizers to protect against chemical degradation and aggregate formation. Stabilizers may include antioxidants such as butylated hydroxy anisole (BHA), and butylated hydroxy toluene (BHT), buffers (citrate, glycine, histidine) or surfactants (polysorbate 80, poloxamers). The solution may also contain antimicrobial preservatives,

such as benzyl alcohol and parabens. The solution may also contain surfactants to reduce aggregation, such as Polysorbate 80, poloxomer, or other surfactants known in the art. The solution may also contain other additives, such as a sugar(s) or saline, to adjust the osmotic pressure of the composition to be similar to human blood.

73

5 The pharmaceutical compositions may be in the form of a sterile lyophilized powder for injection upon reconstitution with a diluent. The diluent can be water for injection, bacteriostatic water for injection, or sterile saline. The lyophilized powder may be produced by freeze drying a solution of the fusion protein to produce the protein in dry form. As is known in the art, the lyophilized protein generally has increased stability and a longer shelf
10 life than a liquid solution of the protein. The lyophilized powder (cake) may contain a buffer to adjust the pH, as for example physiologically acceptable citrate, acetate, glycine, histidine, phosphate, tris or succinate buffer. The lyophilized powder may also contain lyoprotectants to maintain its physical and chemical stability. The commonly used lyoprotectants are non-reducing sugars and disaccharides such as sucrose, mannitol, or trehalose. The lyophilized
15 powder may contain stabilizers to protect against chemical degradation and aggregate formation. Stabilizers may include, but are not limited to antioxidants (BHA, BHT), buffers (citrate, glycine, histidine), or surfactants (polysorbate 80, poloxamers). The lyophilized powder may also contain antimicrobial preservatives, such as benzyl alcohol and parabens. The lyophilized powder may also contain surfactants to reduce aggregation, such as, but not
20 limited to, Polysorbate 80 and poloxomer. The lyophilized powder may also contain additives (e.g., sugars or saline) to adjust the osmotic pressure to be similar to human blood upon reconstitution of the powder. The lyophilized powder may also contain bulking agents, such as sugars and disaccharides.

The pharmaceutical compositions for injection may also be in the form of a
25 oleaginous suspension. This suspension may be formulated according to the known methods using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents described above. In addition, sterile, fixed oils are conveniently employed as solvent or suspending medium. For this purpose, any bland fixed oil may be employed using synthetic mono- or diglycerides. Also, oily suspensions may be formulated by suspending the active ingredient in a vegetable
30 oil, for example arachis oil, olive oil, sesame oil or coconut oil, or in a mineral oil such as a liquid paraffin. For example, fatty acids such as oleic acid find use in the preparation of injectables. The oily suspensions may contain a thickening agent, for example beeswax, hard paraffin or cetyl alcohol. These compositions may be preserved by the addition of an anti-oxidant such as ascorbic acid.

The pharmaceutical compositions of the present invention may also be in the form of oil-in-water emulsions or aqueous suspensions. The oily phase may be a vegetable oil, for example, olive oil or arachis oil, or a mineral oil, for example a liquid paraffin, or a mixture thereof. Suitable emulsifying agents may be naturally-occurring gums, for example gum acacia or gum tragacanth, naturally-occurring phosphatides, for example soy bean, lecithin, and esters or partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example sorbitan monooleate, and condensation products of said partial esters with ethylene oxide, for example polyoxyethylene sorbitan.

Aqueous suspensions may also contain the active compounds in admixture with excipients. Such excipients may include suspending agents, for example sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, gum tragacanth and gum acacia; dispersing or wetting agents, such as a naturally-occurring phosphatide such as lecithin, or condensation products of an alkylene oxide with fatty acids, for example polyoxyethylene stearate, or condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic alcohols, for example, heptadecaethyl-eneoxycetanol, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example polyethylene sorbitan monooleate.

Dispersible powders and granules suitable for preparation of an aqueous suspension by the addition of water may provide the active compound in admixture with a dispersing agent, suspending agent, and one or more preservatives. Suitable preservatives, dispersing agents, and suspending agents are described above.

The compositions may also be in the form of suppositories for rectal administration of the compounds of the invention. These compositions can be prepared by mixing the drug with a suitable non-irritating excipient which is solid at ordinary temperatures but liquid at the rectal temperature and will thus melt in the rectum to release the drug. Such materials include cocoa butter and polyethylene glycols, for example.

For topical use, creams, ointments, jellies, solutions or suspensions containing the compounds of the invention may be used. Topical applications may also include mouth washes and gargles. Suitable preservatives, antioxidants such as BHA and BHT, dispersants, surfactants, or buffers may be used.

The compounds of the present invention may also be administered in the form of liposome delivery systems, such as small unilamellar vesicles, large unilamellar vesicles, and

multilamellar vesicles. Liposomes may be formed from a variety of phospholipids, such as cholesterol, stearylamine, or phosphatidylcholines.

In certain embodiments, the compounds of the present invention may be modified to further retard clearance from the circulation by metabolic enzymes. In one embodiment, the compounds may be modified by the covalent attachment of water-soluble polymers such as polyethylene glycol (PEG), copolymers of PEG and polypropylene glycol, polyvinylpyrrolidone or polyproline, carboxymethyl cellulose, dextran, polyvinyl alcohol, and the like. Such modifications also may increase the compound's solubility in aqueous solution. Polymers such as PEG may be covalently attached to one or more reactive amino residues, sulfhydryl residues or carboxyl residues. Numerous activated forms of PEG have been described, including active esters of carboxylic acid or carbonate derivatives, particularly those in which the leaving groups are N-hydroxysuccinimide, p-nitrophenol, imidazole or 1-hydroxy-2-nitrobenzene-3 sulfone for reaction with amino groups, multimode or halo acetyl derivatives for reaction with sulfhydryl groups, and amino hydrazine or hydrazide derivatives for reaction with carbohydrate groups.

Additional methods for preparation of protein formulations which may be used with the fusion proteins of the present invention are described in U.S. Patents No. 6,267,958, and 5,567,677.

In a further aspect of the present invention, the RAGE modulators of the invention are utilized in adjuvant therapeutic or combination therapeutic treatments with other known therapeutic agents. The following is a non-exhaustive listing of adjuvants and additional therapeutic agents which may be utilized in combination with the RAGE fusion protein modulators of the present invention:

Pharmacologic classifications of anticancer agents:

1. Alkylating agents: Cyclophosphamide, nitrosoureas, carboplatin, cisplatin, procarbazine
2. Antibiotics: Bleomycin, Daunorubicin, Doxorubicin
3. Antimetabolites: Methotrexate, Cytarabine, Fluorouracil
4. Plant alkaloids: Vinblastine, Vincristine, Etoposide, Paclitaxel,
5. Hormones: Tamoxifen, Octreotide acetate, Finasteride, Flutamide
6. Biologic response modifiers: Interferons, Interleukins,

Pharmacologic classifications of treatment for Rheumatoid Arthritis

1. Analgesics: Aspirin
2. NSAIDs (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs): Ibuprofen, Naproxen, Diclofenac

3. DMARDs (Disease-Modifying Antirheumatic drugs): Methotrexate, gold preparations, hydroxychloroquine, sulfasalazine
4. Biologic Response Modifiers, DMARDs: Etanercept, Infliximab
Glucocorticoids

76

5 Pharmacologic classifications of treatment for Diabetes Mellitus

1. Sulfonylureas: Tolbutamide, Tolazamide, Glyburide, Glipizide
2. Biguanides: Metformin
3. Miscellaneous oral agents: Acarbose, Troglitazone
4. Insulin

10 Pharmacologic classifications of treatment for Alzheimer's Disease

1. Cholinesterase Inhibitor: Tacrine, Donepezil
2. Antipsychotics: Haloperidol, Thioridazine
3. Antidepressants: Desipramine, Fluoxetine, Trazodone, Paroxetine
4. Anticonvulsants: Carbamazepine, Valproic acid

5 In one embodiment, the present invention may therefore provide a method of treating RAGE mediated diseases, the method comprising administering to a subject in need thereof, a therapeutically effective amount of a RAGE fusion protein in combination with therapeutic agents selected from the group consisting of alkylating agents, antimetabolites, plant alkaloids, antibiotics, hormones, biologic response modifiers, analgesics, NSAIDs, DMARDs, glucocorticoids, sulfonylureas, biguanides, insulin, cholinesterase inhibitors, antipsychotics, antidepressants, and anticonvulsants. In a further embodiment, the present invention provides the pharmaceutical composition of the invention as described above, further comprising one or more therapeutic agents selected from the group consisting of alkylating agents, antimetabolites, plant alkaloids, antibiotics, hormones, biologic response

20 modifiers, analgesics, NSAIDs, DMARDs, glucocorticoids, sulfonylureas, biguanides, insulin, cholinesterase inhibitors, antipsychotics, antidepressants, and anticonvulsants.

25

EXAMPLES

Features and advantages of the inventive concept covered by the present invention are further illustrated in the examples which follow.

30 Example 1: Production of RAGE-IgG Fc Fusion Proteins

Two plasmids were constructed to express RAGE-IgG Fc fusion proteins. Both plasmids were constructed by ligating different lengths of a 5' cDNA sequence from human RAGE with the same 3' cDNA sequence from human IgG Fc ($\gamma 1$). These expression sequences (*i.e.*, ligation products) were then inserted in pcDNA3.1 expression vector

37

(Invitrogen, CA). The nucleic acid sequences that encode the fusion protein coding region are shown in FIGS. 2 and 3. For TTP-4000 fusion protein, the nucleic acid sequence from 1 to 753 (highlighted in bold) encodes the RAGE N-terminal protein sequence, whereas the nucleic acid sequence from 754 to 1386 encodes the IgG Fc protein sequence (FIG. 2). For TTP-3000, the nucleic acid sequence from 1 to 408 (highlighted in bold) encodes the RAGE N-terminal protein sequence, whereas the nucleic acid sequence from 409 to 1041 encodes the IgG Fc protein sequence (FIG. 3).

To produce the RAGE fusion proteins, the expression vectors comprising the nucleic acid sequences of either SEQ ID NO: 30 or SEQ ID NO: 31 were stably transfected into CHO cells. Positive transformants were selected for neomycin resistance conferred by the plasmid and cloned. High producing clones as detected by Western Blot analysis of supernatant were expanded and the gene product was purified by affinity chromatography using Protein A columns. Expression was optimized so that cells were producing recombinant TTP-4000 at levels of about 1.3 grams per liter.

The expressed polypeptides encoding the two fusion proteins are illustrated in FIGS. 4-6. For the four domain structure of TTP-4000, the first 251 amino acids (shown in bold in FIG. 4) contain a signal sequence (1-22/23), the V immunoglobulin (and ligand binding) domain (23/24-116), a second interdomain linker (117-123), a second immunoglobulin domain (C_H1) (124-221), and a second linker (222-251) of the human RAGE protein (FIGS. 4, 6B). The sequence from 252 to 461 includes the C_H2 and C_H3 immunoglobulin domains of IgG.

For the three domain structure of TTP-3000, the first 136 amino acids (shown in bold) contain a signal sequence (1-22/23), the V immunoglobulin (and ligand binding) domain (23/24-116) and an interdomain linker sequence (117-136) of the human RAGE protein (FIGS. 5, 6B). In addition, for TT3, the sequence from 137 to 346 includes the C_H2 and C_H3 immunoglobulin domains of IgG.

Example 2: Method for testing activity of a RAGE-IgG1 fusion protein

A. *In vitro* ligand binding:

Known RAGE ligands were coated onto the surface of Maxisorb plates at a concentration of 5 micrograms per well. Plates were incubated at 4°C overnight. Following ligand incubation, plates were aspirated and a blocking buffer of 1% BSA in 50 mM imidazole buffer (pH 7.2) was added to the plates for 1 hour at room temperature. The plates were then aspirated and/or washed with wash buffer (20 mM Imidazole, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 5 mM CaCl₂ and 5mM MgCl₂, pH 7.2). A solution of TTP-3000 (TT3) at

78

an initial concentration of 1.082 mg/mL and a solution of TTP-4000 (TT4) at an initial concentration of 370 µg/mL were prepared. The fusion protein was added at increasing dilutions of the initial sample. The RAGE fusion protein was allowed to incubate with the immobilized ligand at 37°C for one hour after which the plate was washed and assayed for binding of the fusion protein. Binding was detected by the addition of an immunodetection complex containing a monoclonal mouse anti-human IgG1 diluted 1:11,000 to a final assay concentration (FAC) of 21 ng/100 µL, a biotinylated goat anti-mouse IgG diluted 1:500, to a FAC of 500 ng/µL, and an avidin-linked alkaline phosphatase. The complex was incubated with the immobilized fusion protein for one hour at room temperature after which the plate was washed and the alkaline phosphatase substrate *para*-nitrophenylphosphate (PNPP) was added. Binding of the complex to the immobilized fusion protein was quantified by measuring conversion of PNPP to *para*-nitrophenol (PNP) which was measured spectrophotometrically at 405 nm.

As illustrated in FIG. 7, the fusion proteins TTP-4000 (TT4) and TTP-3000 (TT3) specifically interact with known RAGE ligands amyloid-beta (Abeta), S100b (S100), and amphoterin (Ampho). In the absence of ligand, i.e., BSA coating alone (BSA or BSA + wash) there was no increase in absorbance over levels attributable to non-specific binding of the immunodetection complex. Where amyloid beta is used as the labeled ligand it may be necessary to preincubate the amyloid beta before the assay. Preincubation may allow the amyloid beta to self-aggregate into pleated sheet form, as amyloid beta may preferentially bind to RAGE in the form of a pleated sheet.

Additional evidence for a specific interaction between RAGE fusion proteins TTP-4000 and TTP-3000 with RAGE ligands is exemplified in studies showing that a RAGE ligand is able to effectively compete with a known RAGE ligand for binding to the fusion proteins. In these studies, amyloid-beta (A-beta) was immobilized on a Maxisorb plate and fusion protein added as described above. In addition, a RAGE ligand was added to some of the wells at the same time as the fusion protein.

It was found that the RAGE ligand could block binding of TTP-4000 (TT4) by about 25% to 30% where TTP-4000 was present at 123 µg/mL (1:3 dilution, FIG. 8). When the initial solution of TTP-4000 was diluted by a factor of 10 or 30 (1:10 or 1:30), binding of the fusion protein to the immobilized ligand was completely inhibited by the RAGE ligand. Similarly, the RAGE ligand blocked binding of TTP-3000 (TT3) by about 50% where TTP-3000 was present at 360 µg/mL (1:3 dilution, FIG. 9). When the initial solution of TTP-3000

was diluted by a factor of 10 (1:10), binding of the fusion protein to the immobilized ligand was completely inhibited by the RAGE ligand. Thus, specificity of binding of the RAGE fusion protein to the RAGE ligand was dose dependent. Also, as shown in FIGS. 8 and 9, there was essentially no binding detected in the absence of fusion protein, i.e., using only the immunodetection complex ("Complex alone").

B. Effect of RAGE fusion proteins in a cell based assay

Previous work has shown that the myeloid THP-1 cells may secrete TNF- α in response to RAGE ligands. In this assay, THP-1 cells were cultured in RPMI-1640 media supplemented with 10% FBS using a protocol provided by ATCC. The cells were induced to secrete TNF- α via stimulation of RAGE with 0.1 mg/ml S100b both in the absence and the presence of the fusion proteins TTP-3000 (TT3) or TTP-4000 (TT4) (10 μ g), sRAGE (10 μ g), and a human IgG (10 μ g) (i.e., as a negative control). The amount of TNF- α secreted by the THP-1 cells was measured 24 hours after the addition of the proteins to the cell culture using a commercially available ELISA kit for TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN). The results in FIG. 10 demonstrate that the fusion proteins inhibit the S100b/RAGE-induced production of TNF- α in these cells. As shown in FIG. 10, upon addition of 10 μ g TTP-3000 or TTP-4000 RAGE fusion protein, induction of TNF- α by S100b (0.1 mg/ml FAC) was reduced by about 45% to 70%, respectively. Fusion protein TTP-4000 may be at least as effective in blocking S100b induction of TNF- α as is sRAGE (FIG. 10). Specificity of the inhibition for the RAGE sequences of TTP-4000 and TTP-3000 is shown by the experiment in which IgG alone was added to S100b stimulated cells. Addition of IgG and S100b to the assay shows the same levels of TNF- α as S100b alone. Specificity of the inhibition of TNF- α induction by TTP-4000 and TTP-3000 for RAGE sequences of the fusion protein is shown by an experiment in which IgG alone was added to S100b stimulated cells. It can be seen that the addition of IgG, i.e., human IgG without the RAGE sequence (Sigma human IgG added at 10 μ g/well), and S100b to the assay shows the same levels of TNF- α as S100b alone.

Example 3: Pharmacokinetic Profile of TTP-4000

To determine whether TTP-4000 would have a superior pharmacokinetic profile as compared to human sRAGE, rats and nonhuman primates were given an intravenous (IV) injection of TTP-4000 (5mg/kg) and then plasma was assessed for the presence of TTP-4000. In these experiments, two naïve male monkeys received a single IV bolus dose of TTP-4000 (5mg/ml/kg) in a peripheral vein followed by an approximate 1.0 milliliter (mL) saline flush. Blood samples (approximately 1.0 mL) were collected at pre-dose (i.e., prior to injection of

the TTP-4000), or at 0.083, 0.25, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 288, and 336 hours post dose into tubes containing (lithium heparin). Following collection, the tubes were placed on wet ice (maximum 30 minutes) until centrifugation under refrigeration (at 2 to 8°C) at 1500 x g for 15 minutes. Each harvested plasma sample was then stored frozen (-70 °C ±10 ° C) until assayed for RAGE polypeptide using an ELISA at various time-points following the injection, as described in Example 6.

The kinetic profile shown in FIG. 11 reveals that once TTP-4000 has saturated its ligands as evidenced by the fairly steep slope of the alpha phase in 2 animals, it retains a terminal half-life of greater than 300 hours. This half-life is significantly greater than the half-life of human sRAGE in plasma (generally about 2 hours) and provides an opportunity for single injections for acute and semi-chronic indications. In FIG. 11 each curve represents a different animal under the same experimental conditions.

Example 4: TTP-4000 Fc Activation

Experiments were performed to measure the activation of the Fc receptor by RAGE fusion protein TTP-4000 as compared to human IgG. Fc receptor activation was measured by measuring TNF- α secretion from THP-1 cells that express the Fc receptor. In these experiments, a 96 well plate was coated with 10 μ g/well TTP-4000 or human IgG. Fc stimulation results in TNF- α secretion. The amount of TNF- α was measured by an Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA).

Thus, in this assay, the myeloid cell line, THP-1 (ATTC # TIB-202) was maintained in RPMI-1640 media supplemented with 10% fetal bovine serum per ATCC instructions. Typically, 40,000-80,000 cells per well were induced to secrete TNF-alpha via Fc receptor stimulation by precoating the well with 10 μ g/well of either heat aggregated (63°C for 30 min) TTP-4000 or human IgG1. The amount of TNF-alpha secreted by the THP-1 cells was measured in supernatants collected from 24 hours cultures of cells in the treated wells using a commercially available TNF ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN # DTA00C) per instructions.

Results are shown in FIG. 12 where it can be seen that TTP-4000 generates less than 2 ng/well TNF and IgG generated greater than 40 ng/well.

Example 5: In vivo activity of TTP-4000

The activity of TTP-4000 was compared to sRAGE in several *in vivo* models of human disease.

97

A. TTP-4000 in an animal model of restenosis

The RAGE fusion protein TTP-4000 was evaluated in a diabetic rat model of restenosis which involved measuring smooth muscle proliferation and intimal expansion 21 days following vascular injury. In these experiments, balloon injury of left common carotid artery was performed in Zucker diabetic and nondiabetic rats using standard procedure. A loading dose (3mg/rat) of IgG, TTP-4000 or phosphate buffered saline (PBS) was administered intraperitoneally (IP) one day prior injury. A maintenance dose was delivered every other day until day 7 after injury (i.e., at day 1, 3, 5 and 7 after injury). The maintenance dose was high = 1 mg/animal for one group, or low = 0.3 mg/animal for the second group. To measure vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation, animals were sacrificed at 4 days and 21 days after injury.

For the measurement of cell proliferation, 4 day animals received intraperitoneal injection of bromodeoxyuridine (BrdU) 50 mg/kg at 18, 12, and 2 hours before euthanasia. After sacrifice, the entire left and right carotid arteries were harvested. Specimens were stored in Histochoice for at least 24 hours before embedding. Assessment of VSMC proliferation was performed using mouse anti-BrdU monoclonal antibody. A fluorescence labeled goat anti-mouse secondary antibody was applied. The number of BrdU-positive nuclei per section were counted by two observers blinded to the treatment regimens.

The remaining rats were sacrificed at 21 days for morphometric analysis. Morphometric analyses were performed by an observer blinded to the study groups, using computerized digital microscopic planimetry software Image-Pro Plus on serial sections, (5 mm apart) carotid arteries stained by Van Gieson staining. All data were expressed as mean $\pm$ SD. Statistical analysis was performed with use of SPSS software. Continuous variables were compared using unpaired t tests. A values of $P \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

As seen in FIGS. 13A and 13B, TTP-4000 treatment significantly reduced the intima/media ratio and vascular smooth muscle cell proliferation in a dose-responsive fashion. In FIG. 13 B, the y-axis represents the number of BrdU proliferating cells.

B. TTP4000 in an animal model of AD

Experiments were performed to evaluate whether TTP-4000 could affect amyloid formation and cognitive dysfunction in a mouse model of AD. The experiments utilized transgenic mice expressing the human Swedish mutant amyloid precursor protein (APP) under the control of the PDGF-B chain promoter. Over time, these mice generate high levels

of the RAGE ligand, amyloid beta (A β). Previously, sRAGE treatment for 3 months has been shown to reduce both amyloid plaque formation in the brain and the associated increase in inflammatory markers in this model. 

The APP mice (male) used in this experiment were designed by microinjection of the human APP gene (with the Swedish and London mutations) into mouse eggs under the control of the platelet-derived growth factor B (PDGF-B) chain gene promoter. The mice were generated on a C57BL/6 background and were developed by Molecular Therapeutics Inc. Animals were fed *ad libitum* and maintained by brother sister mating. The mice generated from this construct develop amyloid deposits starting at 6 months of age. Animals were aged for 6 months and then maintained for 90 days and sacrificed for amyloid quantification.

APP transgenic mice were administered vehicle or TTP4000 every other day [qod (i.p.)] for 90 days starting at 6 months of age. At the end of the experiment, animals were sacrificed and examined for A β plaque burden in the brain (i.e., plaque number). A 6-month control APP group was used to determine the baseline of amyloid deposits. In addition, at the end of the study, the animals were subjected to behavioral (Morris water maze) analysis. The investigators were blinded to the study compounds. Samples were given to the mice at 0.25 ml/mouse/every other day. In addition, one group of mice were given 200 ug/day of human sRAGE.

1. Amyloid Beta Deposition

For histological examination, the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection (IP) of sodium pentobarbital (50 mg/kg). The animals were transcardially perfused with 4°C, phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde. The brains were removed and placed in 4% paraformaldehyde over night. The brains were processed to paraffin and embedded. Ten serial 30- μ m thick sections through the brain were obtained.

Sections were subjected to primary antibody overnight at 4°C (A β peptide antibody) in order to detect the amyloid deposits in the brain of the transgenic animals (Guo *et al.*, *J. Neurosci.*, 22:5900-5909 (2002)). Sections were washed in Tris-buffered saline (TBS) and secondary antibody was added and incubated for 1 hour at room temperature. After washing, the sections were incubated as instructed in the Vector ABC Elite kit (Vector Laboratories) and stained with diaminobenzoic acid (DAB). The reactions were stopped in water and cover-slipped after treatment with xylene. The amyloid area in each section was determined with a computer-assisted image analysis system, consisting of a Power Macintosh computer equipped with a Quick Capture frame grabber card, Hitachi CCD camera mounted on an

Olympus microscope and camera stand. NIH Image Analysis Software, v. 1.55 was used. The images were captured and the total area of amyloid was determined over the ten sections. A single operator blinded to treatment status performed all measurements. Summing the amyloid volumes of the sections and dividing by the total number of sections was done to calculate the amyloid volume.

For quantitative analysis, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of human total A β , A β_{total} and A β_{1-42} in the brains of APP transgenic mice (Biosource International, Camarillo, CA). A β_{total} and A β_{1-42} were extracted from mouse brains by guanidine hydrochloride and quantified as described by the manufacturer. This assay extracts the total A β peptide from the brain (both soluble and aggregated).

2. *Cognitive Function*

The Morris water-maze testing was performed as follows:. All mice were tested once in the Morris water maze test at the end of the experiment. Mice were trained in a 1.2 m open field water maze. The pool was filled to a depth of 30 cm with water and maintained at 25°C. The escape platform (10 cm square) was placed 1 cm below the surface of the water. During the trials, the platform was removed from the pool. The cued test was carried out in the pool surrounded with white curtains to hide any extra-maze cues. All animals underwent non-spatial pretraining (NSP) for three consecutive days. These trials are to prepare the animals for the final behavioral test to determine the retention of memory to find the platform. These trials were not recorded, but were for training purposes only. For the training and learning studies, the curtains were removed to extra maze cues (this allowed for identification of animals with swimming impairments). On day 1, the mice were placed on the hidden platform for 20 seconds (trial 1), for trials 2-3 animals were released in the water at a distance of 10 cm from the cued-platform or hidden platform (trial 4) and allowed to swim to the platform. On the second day of trails, the hidden platform was moved randomly between the center of the pool or the center of each quadrant. The animals were released into the pool, randomly facing the wall and were allowed 60 seconds to reach the platform (3 trials). In the third trial, animals were given three trials, two with a hidden platform and one with a cued platform. Two days following the NSP, animals were subjected to final behavioral trials (Morris water maze test). For these trials (3 per animal), the platform was placed in the center of one quadrant of the pool and the animals released facing the wall in a random fashion. The animal was allowed to find the platform or swim for 60 seconds (latency period,

the time it takes to find the platform). All animals were tested within 4-6 hours of dosing and were randomly selected for testing by an operator blinded to the test group. 81

The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviations (SD). The significance of differences in the amyloid and behavioral studies were analyzed using a t-test. Comparisons were made between the 6-month-old APP control group and the TTP-4000 treated animals, as well as, the 9-month-old APP vehicle treated group and the TTP-4000 treated animals. Differences below 0.05 were considered significant. Percent changes in amyloid and behavior were determined by taking the summation of the data in each group and dividing by the comparison (i.e., 1, i.p./6 month control = % change).

FIGS. 14A and 14B show that mice treated for 3 months with either TTP-4000 or mouse sRAGE had fewer A β plaques and less cognitive dysfunction than vehicle and negative control human IgG1 (IgG1) treated animals. This data indicates that TTP-4000 is effective in reducing AD pathology in a transgenic mouse model. It was also found that like sRAGE, TTP-4000 can reduce the inflammatory cytokines IL-1 and TNF- α (data not shown).

C. Efficacy of TTP-4000 in an animal model of stroke

TTP-4000 was also compared to sRAGE in a disease relevant animal model of stroke. In this model, the middle carotid artery of a mouse was ligated for 1 hour followed by 23 hours of reperfusion at which point the mice were sacrificed and the area of the infarct in the brain was assessed. Mice were treated with sRAGE or TTP-4000 or control immunoglobulin just prior to reperfusion.

In these experiments, male C57BL/6 were injected with vehicle at 250 μ l/mouse or TTP test articles (TTP-3000, TTP-4000 at 250 μ l/mouse). Mice were injected intraperitoneally, 1 hour after the initiation of ischemia. Mice were subjected to one hour of cerebral ischemia followed by 24 hours of reperfusion. To induce ischemia, each mouse was anesthetized and body temperature was maintained at 36-37°C by external warming. The left common carotid artery (CCA) was exposed through a midline incision in the neck. A microsurgical clip was placed around the origin of the internal carotid artery (ICA). The distal end of the ECA was ligated with silk and transected. A 6-0 silk was tied loosely around the ECA stump. The fire-polished tip of a nylon suture was gently inserted into the ECA stump. The loop of the 6-0 silk was tightened around the stump and the nylon suture was advanced into and through the internal carotid artery (ICA), until it rested in the anterior cerebral artery, thereby occluding the anterior communicating and middle cerebral arteries. After the nylon suture had been in place for 1 hour, the animal was

re-anesthetized, rectal temperature was recorded and the suture was removed and the incision closed.

Infarct volume was determined by anesthetizing the animals with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg) and then removing the brains. The brains were then sectioned into four 2-mm sections through the infarcted region and placed in 2% triphenyltetrazolium chloride (TTC) for 30 minutes. After, the sections were placed in 4% paraformaldehyde over night. The infarct area in each section was determined with a computer-assisted image analysis system, consisting of a Power Macintosh computer equipped with a Quick Capture frame grabber card, Hitachi CCD camera mounted on a camera stand. NIH Image Analysis Software, v. 1.55 was used. The images were captured and the total area of infarct was determined over the sections. A single operator blinded to treatment status performed all measurements. Summing the infarct volumes of the sections calculated the total infarct volume. The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). The significance of difference in the infarct volume data was analyzed using a t-test.

As illustrated by the data in Table 2, TTP-4000 was more efficacious than sRAGE in limiting the area of infarct in these animals suggesting that TTP-4000, because of its better half-life in plasma, was able to maintain greater protection in these mice.

Example 6: Detection of RAGE Fusion Protein by ELISA

Initially, 50 μ L of the RAGE specific monoclonal antibody 1HB1011 at a concentration of 10 μ g/mL in 1X PBS pH 7.3 is coated on plates via overnight incubation. When ready for use, plates are washed three times with 300 μ L of 1X Imidazole-Tween wash buffer and blocked with 1% BSA. The samples (diluted) and standard dilutions of known TTP-4000 dilutions are added at 100 μ L final volume. The samples are allowed to incubate at room temperature for one hour. After incubation, the plates are washed three times. A Goat Anti-human IgG1 1 (Sigma A3312) AP conjugate in 1XPBS with 1% BSA is added and allowed to incubate at room temperature for 1 hour. The plates are washed three times. Color was elucidated with paramitrophenylphosphate.

Example 7: Quantification of RAGE Ligand Binding to RAGE Fusion Protein

Figure 15 shows saturation-binding curves with TTP-4000 to various immobilized known RAGE ligands. The ligands are immobilized on a microtiter plate and incubated in the presence of increasing concentrations of fusion protein from 0 to 360 nM. The fusion protein-ligand interaction is detected using a polyclonal antibody conjugated with alkaline phosphatase that is specific for the IgG portion of the fusion chimera. Relative Kds were calculated using Graphpad Prism software and match with established literature values of

RAGE-RAGE ligand values. HMG1B = Ampoterin, CML= Carboxymethyl Lysine, A beta = Amyloid beta 1-40.

86

The foregoing is considered as illustrative only of the principal of the invention. Since numerous modifications and changes will readily occur to those skilled in the art, it is
5 not intended to limit the invention to the exact embodiments shown and described, and all suitable modifications and equivalents falling within the scope of the appended claims are deemed within the present inventive concept.

That which is claimed is:

07

1. A fusion protein comprising a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide wherein the RAGE polypeptide comprises a RAGE ligand binding site.

2 The fusion protein of claim 1, wherein the RAGE polypeptide is linked to a polypeptide comprising an immunoglobulin domain or a portion of an immunoglobulin domain.

3. The fusion protein of claim 2, wherein the polypeptide comprising an immunoglobulin domain comprises at least a portion of at least one of the C_H2 or the C_H3 domains of a human IgG.

4. The fusion protein of claim 1, wherein the RAGE ligand binding site comprises SEQ ID NO: 9 or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10 or a sequence 90% identical thereto.

5. The fusion protein of claim 1, wherein the RAGE polypeptide comprises the amino acid sequence SEQ ID NO: 8 corresponding to amino acids 24-116 of human RAGE.

6. The fusion protein of claim 1, wherein the RAGE polypeptide comprises the amino acid sequence SEQ ID NO: 14 corresponding to amino acids 24-123 of human RAGE.

7. The fusion protein of claim 1, wherein the RAGE polypeptide comprises the amino acid sequence SEQ ID NO: 18 corresponding to amino acids 24-226 of human RAGE.

8. The fusion protein of claim 1, wherein the RAGE polypeptide comprises the amino acid sequence SEQ ID NO: 5 corresponding to amino acids 24-339 of human RAGE or sRAGE.

9. An isolated nucleic acid sequence encoding a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide wherein the RAGE polypeptide comprises a RAGE ligand binding site.

10. The isolated nucleic acid sequence of claim 9, wherein the RAGE polypeptide is linked to a polypeptide comprising an immunoglobulin domain or a portion of an immunoglobulin domain.

11. The isolated nucleic acid sequence of claim 10, wherein the polypeptide comprising an immunoglobulin domain comprises at least a portion of at least one of the C_H2 or the C_H3 domains of a human IgG.

12. The isolated nucleic acid sequence of claim 9, wherein the RAGE ligand binding site comprises SEQ ID NO: 9 or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10 or a sequence 90% identical thereto.

88

13. The isolated nucleic acid sequence of claim 9, comprising SEQ ID NO: 25 or a fragment thereof.
14. The isolated nucleic acid sequence of claim 9, comprising SEQ ID NO: 26 or a fragment thereof.
- 5 15. The isolated nucleic acid sequence of claim 9, comprising SEQ ID NO: 28 or a fragment thereof.
16. A composition comprising a therapeutically effective amount of a RAGE fusion protein in a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the RAGE fusion protein comprises a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide wherein the RAGE
- 10 polypeptide comprises a RAGE ligand binding site.
17. The composition of claim 16, wherein the RAGE polypeptide is linked to a polypeptide comprising an immunoglobulin domain or a portion of an immunoglobulin domain.
18. The composition of claim 17, wherein the polypeptide comprising an immunoglobulin
- 15 domain comprises at least a portion of at least one of the C_H2 or the C_H3 domains of a human IgG.
19. The composition of claim 16, wherein the RAGE ligand binding site comprises SEQ ID NO: 9 or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10 or a sequence 90% identical thereto.
- 20 20. The composition of claim 16, wherein the RAGE polypeptide comprises the amino acid sequence SEQ ID NO: 8 corresponding to amino acids 24-116 of human RAGE.
21. The composition of claim 16, wherein the RAGE fusion protein is formulated as an injectable solution.
22. The composition of claim 16, wherein the RAGE fusion protein is formulated as a
- 25 sterile lyophilized powder.
23. A method of making a RAGE fusion protein comprising the step of covalently linking a RAGE polypeptide linked to a second, non-RAGE polypeptide wherein the RAGE polypeptide comprises a RAGE ligand binding site.
24. The method of claim 23, where the linked RAGE polypeptide and the second, non-
- 30 RAGE polypeptide are encoded by a recombinant DNA construct.
25. The method of claim 24, further comprising the step of incorporating the DNA construct into an expression vector.

89

26. The method of claim 24, further comprising inserting the expression vector into a host cell.

27. A method for the detection of RAGE modulators comprising: (a) providing a fusion protein comprising a RAGE polypeptide comprising a RAGE ligand binding site linked to a second, non-RAGE polypeptide; (b) mixing a compound of interest and a ligand having a known binding affinity for RAGE with the fusion protein; and (c) measuring binding of the known RAGE ligand to the RAGE fusion protein in the presence of the compound of interest.

28. A kit for the detection of RAGE modulators comprising: (a) compound having known binding affinity to RAGE as a positive control; (b) a RAGE fusion protein comprising a RAGE polypeptide comprising a RAGE ligand binding site linked to a second, non-RAGE polypeptide; and (c) instructions for use.

29. A method of treating a RAGE-mediated disorder in a subject comprising administering to a subject a polypeptide comprising a RAGE polypeptide comprising a RAGE ligand binding site linked to a second, non-RAGE polypeptide.

30. The method of claim 29, wherein the RAGE polypeptide is linked to a polypeptide comprising an immunoglobulin domain or a portion of an immunoglobulin domain.

31. The method of claim 30, wherein the polypeptide comprising an immunoglobulin domain comprises at least a portion of at least one of the C_H2 or the C_H3 domains of a human IgG.

32. The method of claim 29, wherein the RAGE ligand binding site comprises SEQ ID NO: 9 or a sequence 90% identical thereto, or SEQ ID NO: 10 or a sequence 90% identical thereto.

33. The method of claim 29, wherein the RAGE polypeptide comprises the amino acid sequence SEQ ID NO: 8 corresponding to amino acids 24-116 of human RAGE.

34. The method of claim 29, comprising intravenous administration of the RAGE fusion protein to the subject.

35. The method of claim 29, comprising intraperitoneal administration of the RAGE fusion protein to the subject.

36. The method of claim 29, comprising subcutaneous administration of the RAGE fusion protein to the subject.

37. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat a symptom of diabetes or a symptom of diabetic late complications.

38. The method of claim 37, wherein the symptom of diabetes or diabetic late complications comprises diabetic nephropathy.

89

39. The method of claim 37, wherein the symptom of diabetes or diabetic late complications comprises diabetic retinopathy.
40. The method of claim 37, wherein the symptom of diabetes or diabetic late complications comprises a diabetic foot ulcer.
- 5 41. The method of claim 37, wherein the symptom of diabetes or diabetic late complications comprises a cardiovascular complication.
42. The method of claim 37, wherein the symptom of diabetes or diabetic late complications comprises diabetic neuropathy.
43. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat amyloidosis.
- 10 44. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat Alzheimer's disease.
45. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat cancer.
46. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation associated with autoimmunity.
- 15 47. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation associated with inflammatory bowel disease.
48. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation associated with rheumatoid arthritis.
49. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation
20 associated with psoriasis.
50. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation associated with multiple sclerosis.
51. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation associated with hypoxia.
- 25 52. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation associated with stroke.
53. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation associated with heart attack.
54. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation
30 associated with hemorrhagic shock.
55. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation associated with sepsis.
56. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation associated with organ transplantation.

57. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat inflammation associated with impaired wound healing.
58. The method of claim 29, wherein the fusion protein is used to treat kidney failure.

90

91

FIG. 1A

HUMAN RAGE (SEO ID NO: 1)

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPOIH WMKDGVPPLP PPSVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALALGILGG
LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
TGGP

HUMAN RAGE WITHOUT SIGNAL SEQUENCE (SEQ ID NO: 2)

		AQNITARI	GEPLVLKCKG	APKKPPQRLE
WKLNTGRTEA	WKVLSPQGGG	PWDSVARVLP	NGSLFLPAVG	IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK	SNYRVRVYQI	PGKPEIVDSA	SELTAGVPNK	VGTCVSEGSY
PAGTLSWHL D	GKPLVPNEKG	VSVKEQTRRH	PETGLFTLQS	ELMVT PARGG
DPRPTFSCSF	SPGLPRHRAL	RTAPIQPRVW	EPVPLEEVQL	VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE	VPAQPS PQIH	WMKDGVP LPL	PPSPVLILPE	IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP	QESRAVSISI	IEPGEGGPTA	GSGVGG SGLGT	LALALGILGG
LGTAALLIGV	ILWQRRQRRG	EERKAPENQE	EEEERAELNQ	SEEPEAGESS
TGGP				

FIG. 1B

HUMAN RAGE WITHOUT SIGNAL SEQUENCE (SEQ ID NO: 3)

		QNITARI	GEPLVLKCKG	APKKPPQRLE
WKLNTGRTEA	WKVLSPOGGG	PWDSVARVLP	NGSLFLPAVG	IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK	SNYRVRVYQI	PGKPEIVDSA	SELTAGVPNK	VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD	GKPLVPNEKG	VSVKEQTRRH	PETGLFTLQS	ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF	SPGLPRHRAL	RTAPIQPRVW	EPVPLEEVQL	VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE	VPAQPSPOIH	WMKDGVPLPL	PPSPVLILPE	IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP	QESRAVSISI	IEPGEEGPTA	GSVGGSGLGT	LALALGILGG
LGTAALLIGV	ILWQRRQRRG	EERKAPENQE	EEEERAELNQ	SEEPEAGESS
TGGP				

FIG. 1C

92

HUMAN RAGE - (SEQ ID NO:4)

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSQIH WMKDGVPPLP PPSVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

HUMAN, RAGE WITHOUT SIGNAL SEQUENCE (SEQ ID NO: 5)

		AQNITARI	GEPLVLKCKG	APKKPPQRLE
WKLNTGRTEA	WKVLSPQGGG	PWDSVARVLP	NGSLFLPAVG	IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK	SNYRVRVYQI	PGKPEIVDSA	SELTAGVPNK	VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD	GKPLVPNEKG	VSVKEQTRRH	PETGLFTLQS	ELMVT PARGG
DPRPTFSCSF	SPGLPRHRAL	RTAPIQPRVW	EPVPLEEVQL	VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE	VPAQFSPQIH	WMKDGVPPLP	PPSPVLILPE	IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP	QESRAVSISI	IEPGEEGPTA	GSVGGSGLG	

HUMAN sRAGE WITHOUT SIGNAL SEQUENCE (SEQ ID NO: 6)

		QNITARI	GEPLVLKCKG	APKKPPQRL
WKLNTGRTEA	WKVLSPQGGG	PWDSVARVLP	NGSLFLPAVG	IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK	SNYRVRVYQI	PGKPEIVDSA	SELTAGVPNK	VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD	GKPLVPNEKG	VSVKEQTRRH	PETGLFTLQS	ELMVTARGG
DPRPTFSCSF	SPGLPRHRAL	RTAPIQPRVW	EPVPLEEVQL	VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE	VPAQPSQPIH	WMKDGVPPLP	PPSPVLILPE	IGPDQGTYS
CVATHSSHGP	QESRAVSISI	IEPGEEGPTA	GSVGGSGLG	

3/26

FIG. 1D

93

HUMAN RAGE V-DOMAIN (SEQ ID NO: 7)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLEFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

HUMAN RAGE V-DOMAIN (SEQ ID NO: 8)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLEFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

V-DOMAIN FRAGMENT OF HUMAN RAGE (SEQ ID NO: 9)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

V-DOMAIN FRAGMENT OF HUMAN RAGE (SEQ ID NO: 10)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 124-221 (SEQ ID NO: 11)

PEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL R

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 227-317 (SEQ ID NO: 12)

PRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVS

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 23-123 (SEQ ID NO: 13)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLEFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGK

4/26

94

FIG. 1 E**HUMAN RAGE AMINO ACIDS 24-123 (SEQ ID NO: 14)**

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGK

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 23-136 (SEQ ID NO: 15)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 24-136 (SEQ ID NO: 16)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 23-226 (SEQ ID NO: 17)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLEFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQ

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 24-226 (SEQ ID NO: 18)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLEFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQ

5/26

95

FIG. 1F**HUMAN RAGE AMINO ACIDS 23-251 (SEQ ID NO: 19)**

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 24-251 (SEQ ID NO: 20)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

RAGE LINKER (SEQ ID NO: 21)

VYQIPGK

RAGE LINKER (SEQ ID NO: 22)

TAPIQPRVWE PVPLEEVQLV VEPEGGAVAP

RAGE LINKER (SEQ ID NO: 23)

VYQIPGKPEI VDSASELTAG

RAGE LINKER (SEQ ID NO: 24)

TAPIQ

FIG. 1G**DNA ENCODING HUMAN RAGE 1-118 (SEQ ID NO: 25)**

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTAC

DNA ENCODING HUMAN RAGE 1-123 (SEQ ID NO: 26)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAG

DNA ENCODING HUMAN RAGE 1-136 (SEQ ID NO: 27)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGT

97

FIG. 1H

DNA ENCODING HUMAN PAGE 1-230 (SEQ ID NO:28)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCCAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCCAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG

DNA ENCODING HUMAN PAGE 1-251 (SEQ ID NO:29)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCCAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCCAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
CCT

8/26

98

FIG. 11**PARTIAL HUMAN C_H2 AND C_H3 DOMAINS (SEQ ID NO: 38)**

PSVF LFPFKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP
IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
LHNHYTQKSL SLSPGK

DNA ENCODING PARTIAL HUMAN C_H2 AND C_H3 DOMAINS (SEQ ID NO: 39)

CCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC
TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

HUMAN C_H2 AND C_H3 DOMAINS (SEQ ID NO: 40)

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

99

FIG. 1J**DNA ENCODING HUMAN C_H2 AND C_H3 DOMAINS (SEQ ID NO: 41)**

CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC AACAAGACCAC
GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA
CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
TCCGGGTAAA TGA

HUMAN C_H2 DOMAIN (SEQ ID NO: 42)

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
LPAPIEKTIS KAK

HUMAN C_H3 DOMAIN (SEQ ID NO: 43)

GQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

RAGE LINKER (SEQ ID NO: 44)

ISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LA

10/26

100

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GCGGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACCTGGAT GGGAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCGAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCGAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
CCTCCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

DNA sequence of RAGE-Fc (TTP-4000) coding region (SEQ ID NO: 30)

FIG. 2

11/26

101

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACAGAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCCGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTCC GTCAGTCTTC CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC
ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA
CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC
ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA
GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA
CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG
CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
GGCAGCCGGA GAACAACCTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG A

DNA sequence of RAGE-Fc (TTP-3000) coding region (SEQ ID NO: 31).

FIG. 3

SEQ ID NO: 32

MAAGTAVGAW ALVLSLWGAV VGAQMITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWELD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRERAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI
SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ
PENNYKTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY
TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 33

AQMITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWELD GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRERAL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSFFL
YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 34

QMITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWELD GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRERAL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSFFL
YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

Alternate sequences encoding a four domain RAGE-Fc IgG fusion protein

FIG. 4

103

SEQ ID NO: 35

MAAGTAVGAW VLVL~~SL~~WGAV VQAQ~~NI~~TARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL~~E~~
 WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWD~~S~~VARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL
 MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS~~N~~KALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTT~~PP~~VLDSD
 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSV~~M~~HEA LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 36

AQ~~NI~~TARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL~~E~~ WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWD~~S~~VARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVS~~N~~KALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTT~~PP~~VLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSV~~M~~HEA LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 37

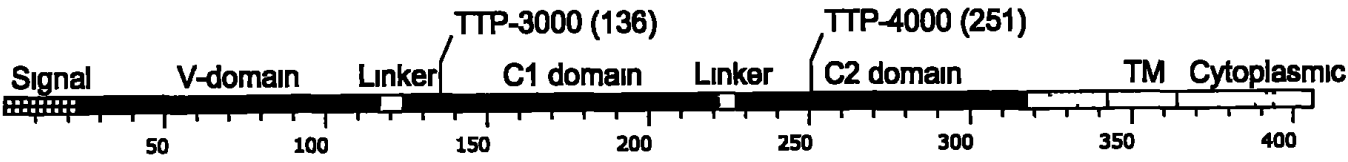
QNITARI GEPLVLKCKG APAKPPQRL~~E~~ WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWD~~S~~VARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVS~~N~~KALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTT~~PP~~VLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSV~~M~~HEA LHNHYTQKSL SLSPGK

Alternate sequences encoding a three domain RAGE-Fc IgG fusion protein

FIG. 5

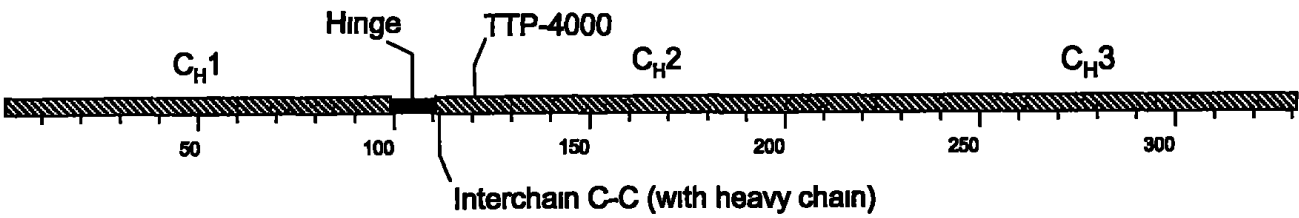
FIG. 6A

hRAGE Domain Structure



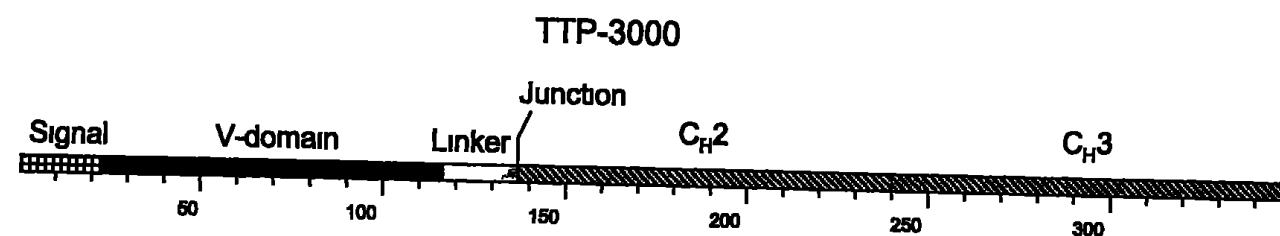
14/26

HUMAN Ig gamma-1 Fc

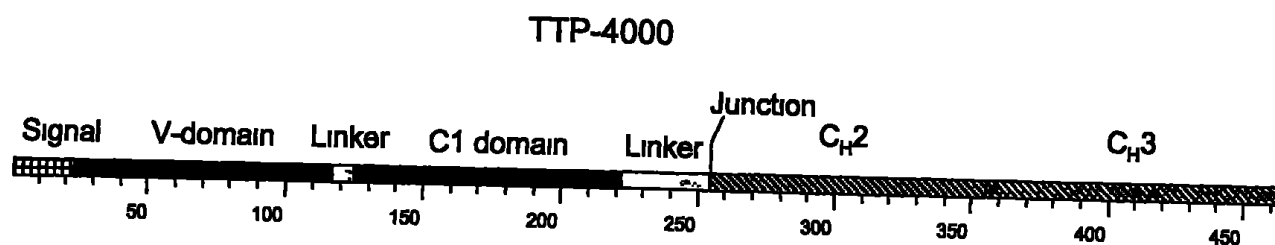


105

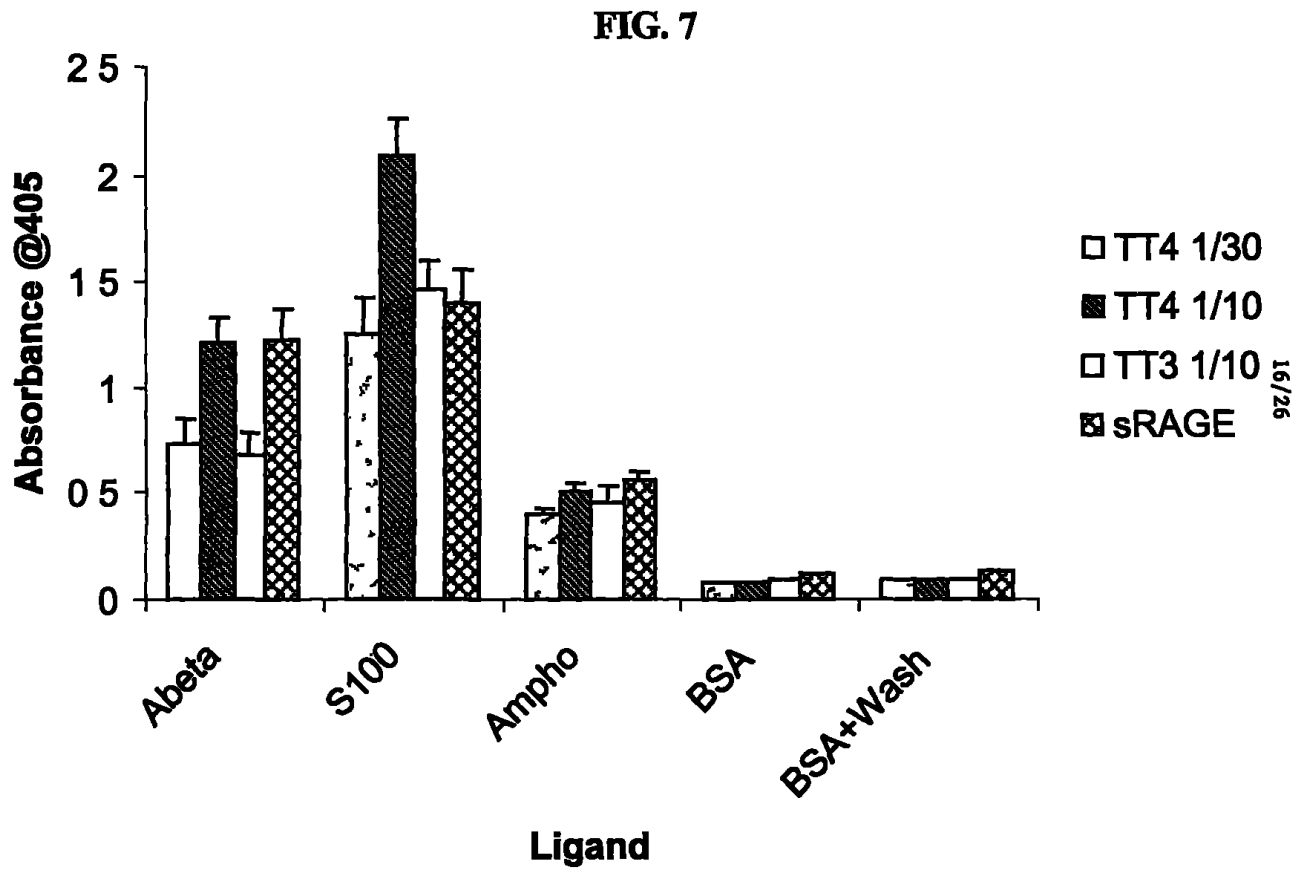
FIG. 6B



15/26

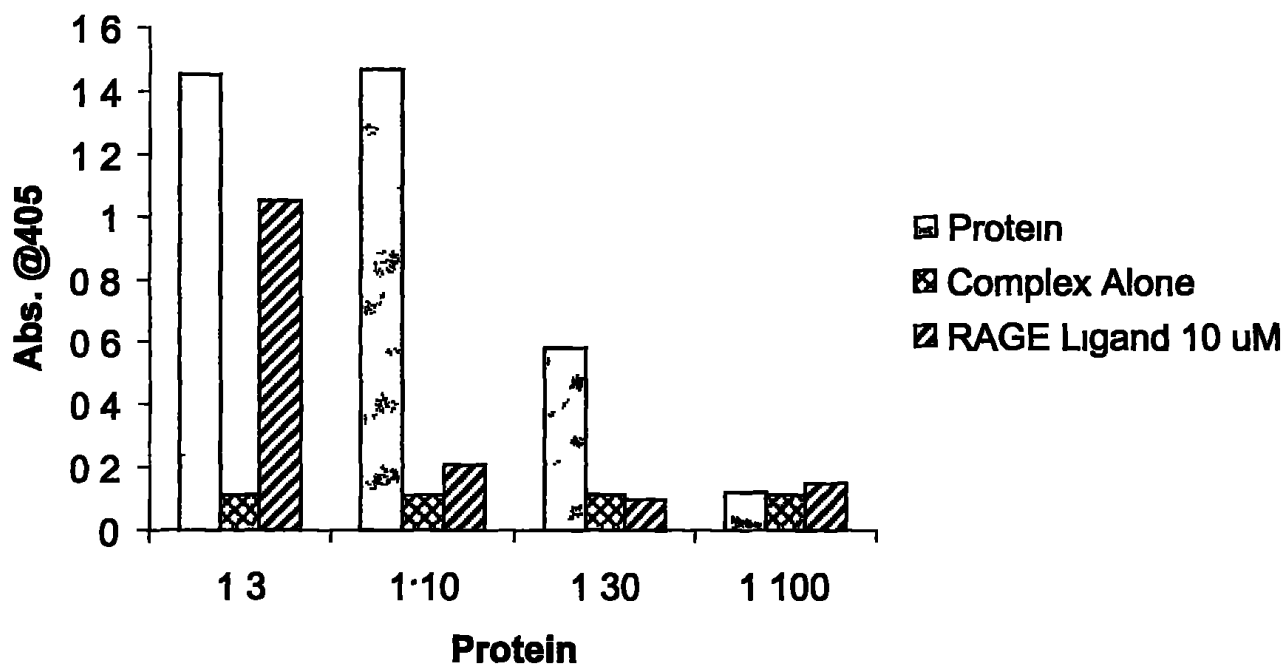


105



107

FIG. 8



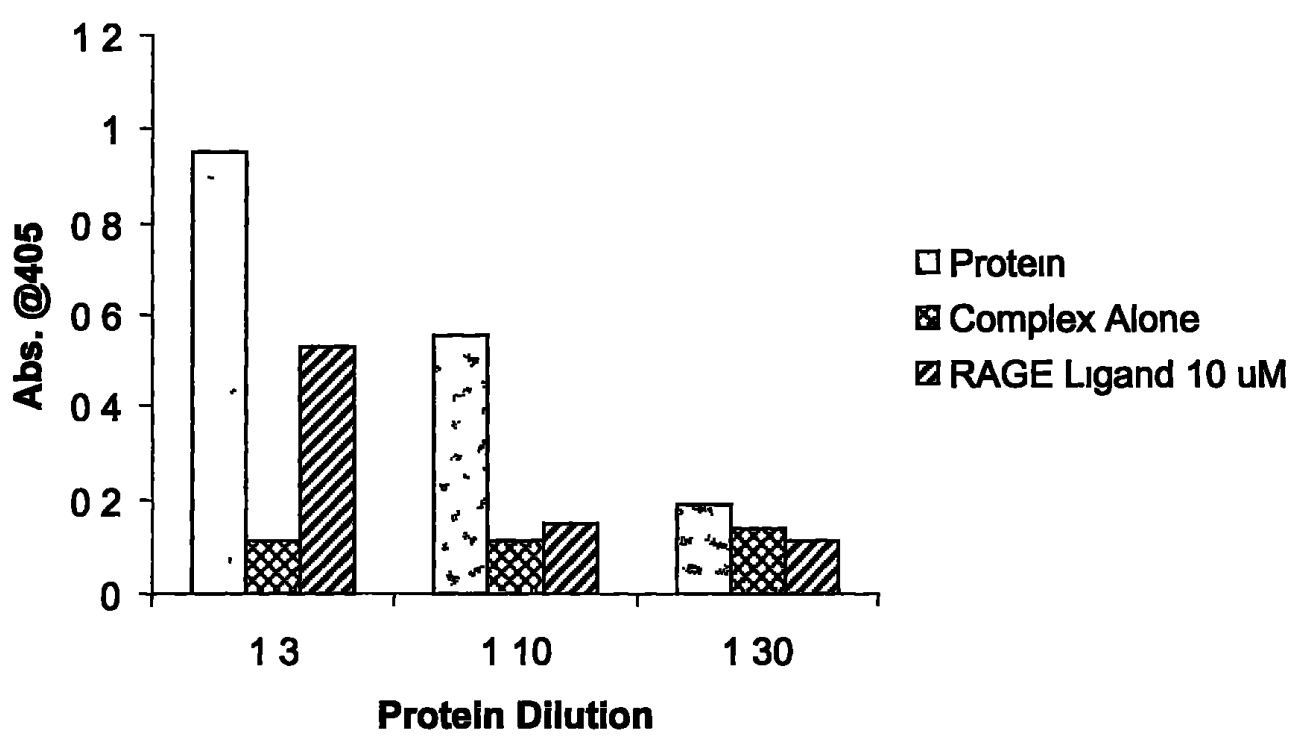
17/26

107

18/26

108

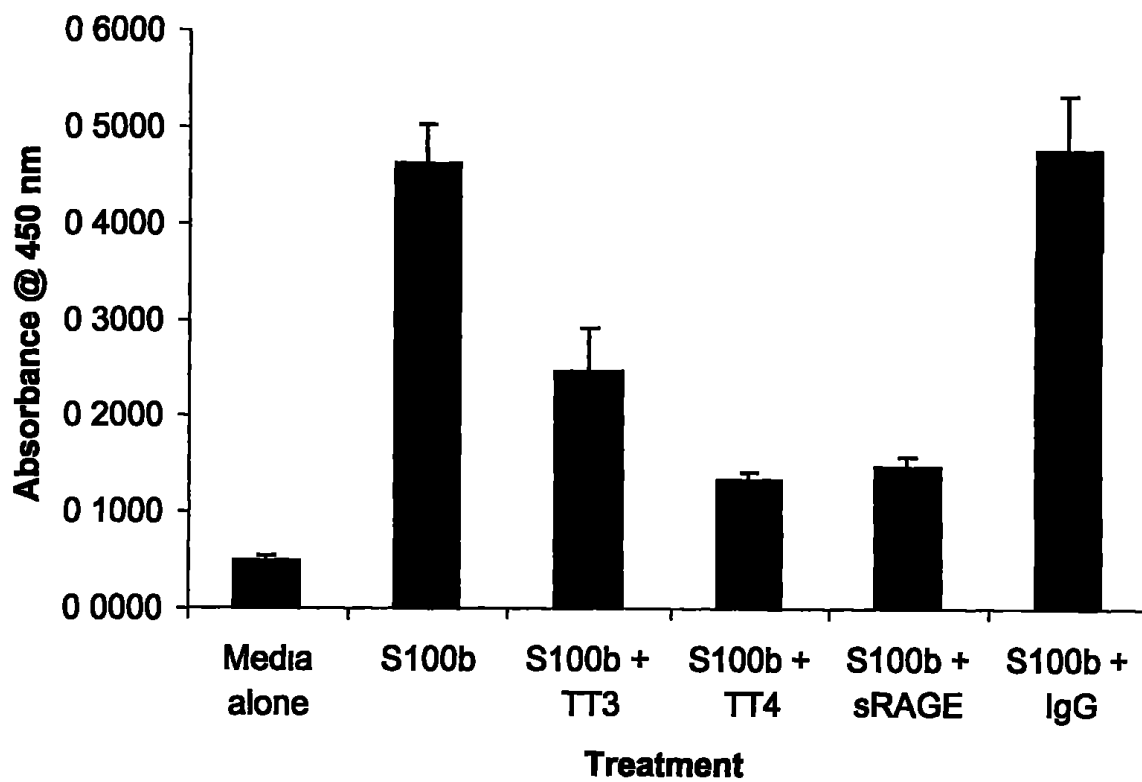
FIG. 9



19/26

109

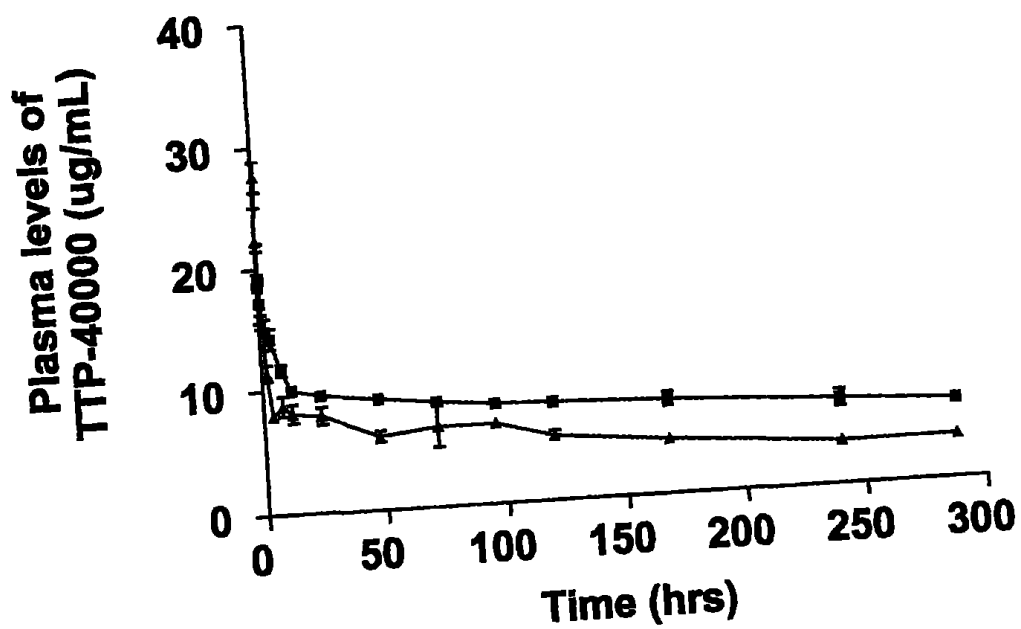
FIG. 10



20/26

110

FIG. 11



111

21/26

14

FIG. 12

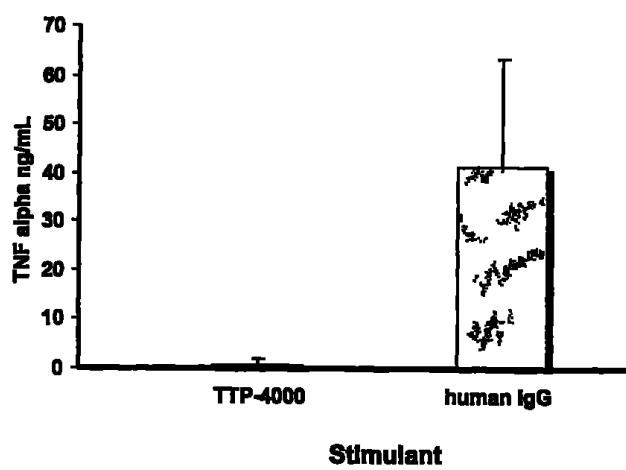


FIG. 13A

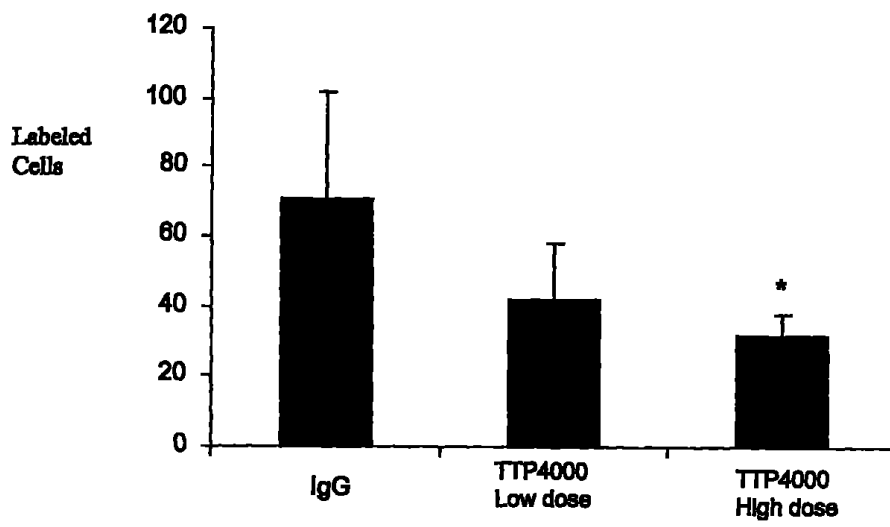
22/26

PCT/US2005/027694

42



FIG. 13B

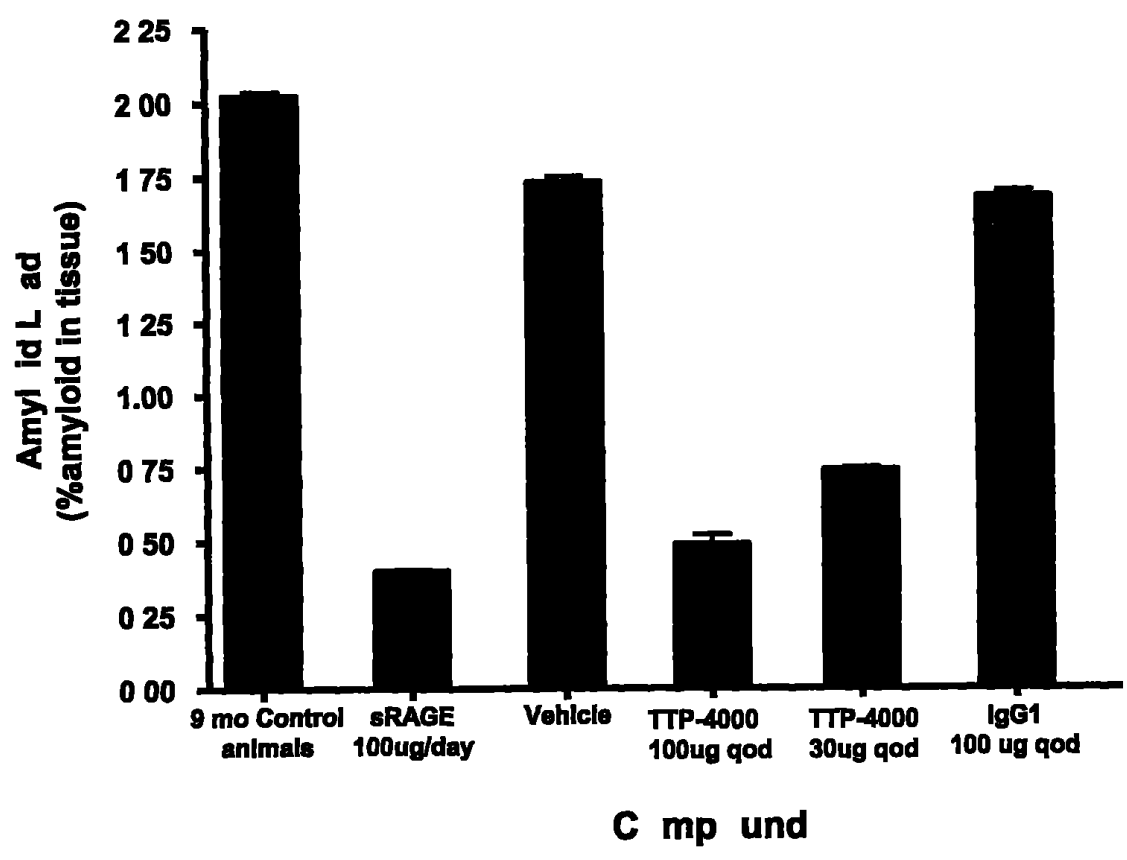


23/26

24/26

~~144~~

FIG. 14A



25/26

1558

FIG. 14B

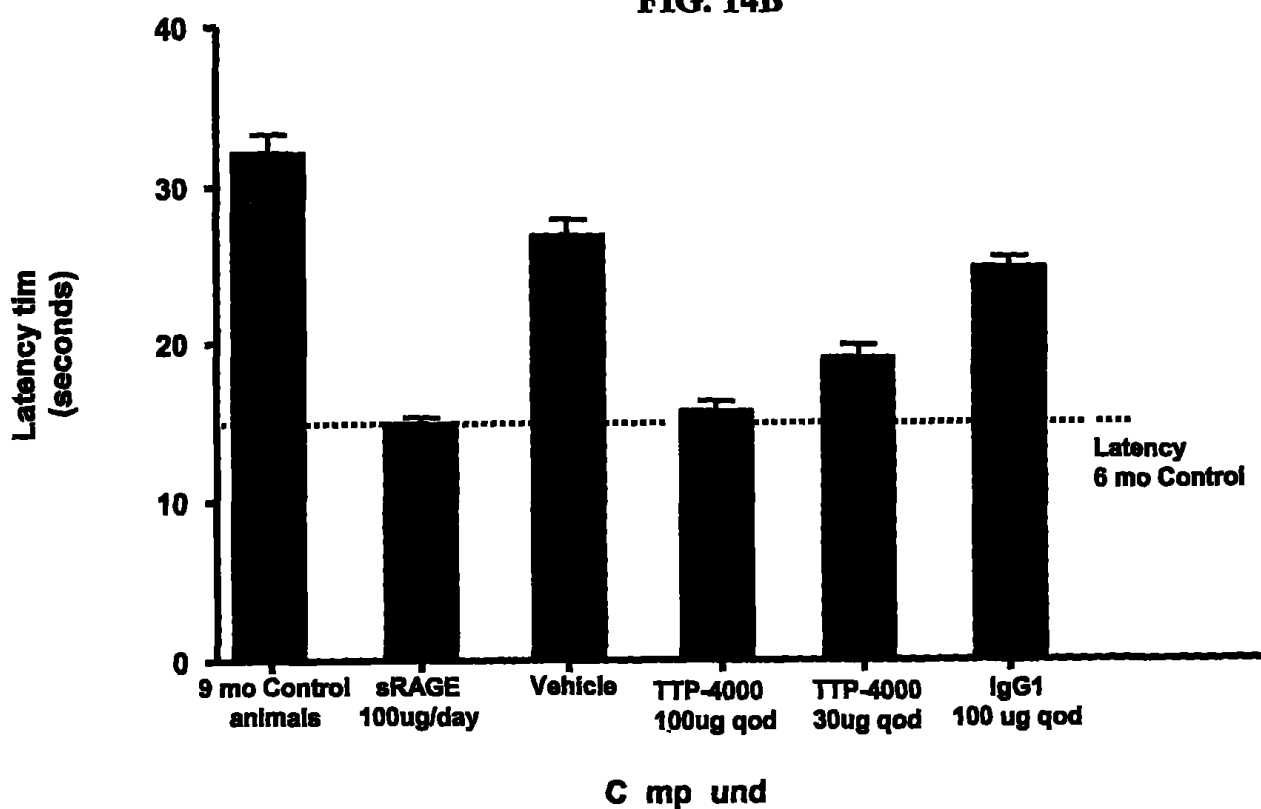
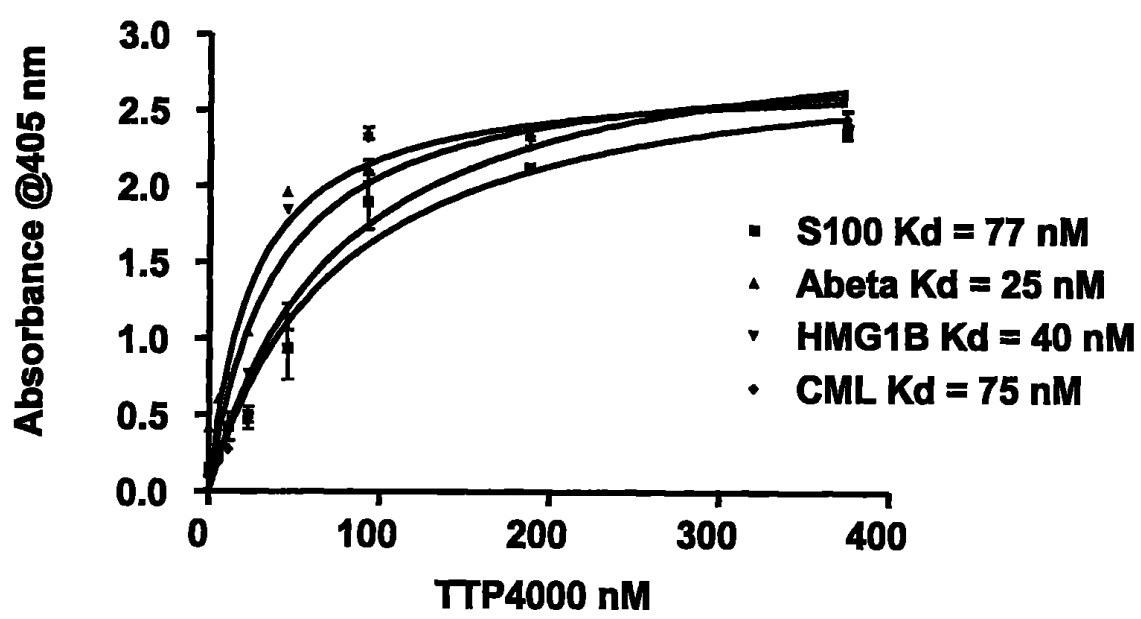


FIG. 15



16

117
46

1

SEQUENCE LISTING

<110> TransTech Pharma, Inc.

<120> RAGE Fusion Proteins and Methods of Use

<130> 41305-318282

<150> US 60/598,362

<151> 2004-08-03

<160> 44

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 404

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp

118
1/5

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

119
48

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
325 330 335

Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly
340 345 350

Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg
355 360 365

Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu
370 375 380

Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser
385 390 395 400

Thr Gly Gly Pro

<210> 2
<211> 382
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

4

120
49

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro
225 230 235 240

Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu
245 250 255

Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln
260 265 270

Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro
275 280 285

121
120

Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu
290 295 300

Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
305 310 315 320

Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Ile
325 330 335

Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys
340 345 350

Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln
355 360 365

Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
370 375 380

<210> 3
<211> 381
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

122
121

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala
225 230 235 240

Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro
245 250 255

Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp
260 265 270

Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln
275 280 285

Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly
290 295 300

Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu
305 310 315 320

Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly
325 330 335

Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala
340 345 350

Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser
355 360 365

Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
370 375 380

<210> 4

<211> 339

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

124

123

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
130 135 140

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
145 150 155 160

Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
165 170 175

Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
180 185 190

Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
210 215 220

Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
245 250 255

Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
260 265 270

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu

275

280

285

Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
 290 295 300

His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
 305 310 315 320

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
 325 330 335

Gly Leu Gly

<210> 5
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
 35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
 50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
 85 90 95

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

10

100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro
225 230 235 240

Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu
245 250 255

Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln
260 265 270

Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro
275 280 285

Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu
290 295 300

11

Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly
305 310 315

<210> 6
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

128

12

128

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala
225 230 235 240

Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro
245 250 255

Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp
260 265 270

Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln
275 280 285

Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly
290 295 300

Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly
305 310 315

<210> 7
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

129

13

128

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg
85 90

<210> 8

<211> 93

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg
85 90

14

ME

<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys
20 25 30

<210> 10
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys
20 25

<210> 11
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn
1 5 10 15

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

Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val
35 40 45

Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr
50 55 60

131

15

130

Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg
 65 70 75 80

Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala
 85 90 95

Leu Arg

<210> 12
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val
 1 5 10 15

Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
 20 25 30

Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp
 35 40 45

Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu
 50 55 60

Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser
 65 70 75 80

Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser
 85 90

<210> 13
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

132

151

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys
100

<210> 14
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

B3

17

B2

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys
100

<210> 15
<211> 114
<212> FRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly

18

<210> 16
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly

<210> 17
<211> 204
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

135

19

238

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
195 200

<210> 18
<211> 203
<212> PRT

136

20

135

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Asn Ile Thr Ala Arg, Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

137

21

B6

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
195 200

<210> 19
<211> 229
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

138

22

13A

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
 165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
 180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
 195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
 210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro
 225

<210> 20
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

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

139

138

23

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro
225

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys
1 5

<210> 22
<211> 30
<212> PRT

140

24

139

<213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu
1 5 10 15

Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro
20 25 30

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu ..
1 5 10 15

Leu Thr Ala Gly
20

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Thr Ala Pro Ile Gln
1 5

<210> 25

<211> 354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctgggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccgatt ggcgagccac tgggtgctgaa gtgtaagggg 120
gcccccaaga aaccaccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
tggaaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240

141

25

198

aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc ggtccgtgt ctac 354

<210> 26
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgtcgttcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgtctc aaaacatcac agcccggtatt ggcgagccac tgggtgtgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca ggggtcggaa tggaaactga acacagggccg gacagaagct 180
 tggaaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc ggtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaag 369

<210> 27
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgtcgttcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgtctc aaaacatcac agcccggtatt ggcgagccac tgggtgtgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca ggggtcggaa tggaaactga acacagggccg gacagaagct 180
 tggaaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc ggtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaatttgt agattctgcc tctgaactca cggctggt 408

<210> 28
 <211> 690
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

```

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta   60
gtagggtgctc aaaacatcac agcccggtatt ggcgagccac tggctgtgaa gtgtaagggg   120
gcccccaaga aaccacocca ggggctggaa tggaaactga acacagggcg gacagaagct   180
tggaagggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc   240
aacggctccc tcttcttccc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag   300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt   360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tcccaataag   420
gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat   480
gggaagcccc tggctgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac   540
cctgagacag ggctottcac actgcaagtgc gagctaatgg tgacccagc ccggggaggga   600
gatccccgtc ccacottctc ctgtagcttc agcccaggcc tccccgaca ccgggccttg   660
cgcacagccc ccatccagcc ccgtgtctgg   690

```

<210> 29

<211> 753

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

```

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta   60
gtagggtgctc aaaacatcac agcccggtatt ggcgagccac tggctgtgaa gtgtaagggg   120
gcccccaaga aaccacocca ggggctggaa tggaaactga acacagggcg gacagaagct   180
tggaagggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc   240
aacggctccc tcttcttccc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag   300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt   360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tcccaataag   420
gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat   480
gggaagcccc tggctgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac   540

```


VB

142

27

cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgaccccagc cgggggagga 600
 gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttccccgaca cggggccttg 660
 cgcacagccc ccattccagcc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg 720
 gtggtggagc cagaagggtg agcagtagct cct 753

<210> 30
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<400> 30
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tgggtgctga gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca ggggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tggaaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggtctcc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tcccaataag 420
 gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcaactggat 480
 gggaaagccc tgggtgcctaa tgagaagggg statctgtga aggaacagac caggagacac 540
 cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgaccccagc cgggggagga 600
 gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttccccgaca cggggccttg 660
 cgcacagccc ccattccagcc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg 720
 gtggtggagc cagaagggtg agcagtagct cctccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780
 cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggta catgcgtggt ggtggacgtg 840
 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
 gccaaagaca agccgcggga ggagcagtao aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc 960

144

143

28

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcagggt ctccaacaaa 1020
 gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1080
 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc 1140
 tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
 cgggagaaca actacaagac cagcctccc gtgotggact ccgacggctc cttcttccctc 1260
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
 gtgatgcatg aggtcttga caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
 aaatga 1386

<210> 31
 <211> 1041
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<400> 31
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgtct aaaaatcac agcccggatt ggcgagccac tgggtgtgaa gtgtaagggg 120
 gcccacaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggcog gacagaagct 180
 tggaaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccctcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag. 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccag tccaaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgoc tctgaactca cggctggtcc gtcagtcttc 420
 ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 480
 gtgggtggtg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 540
 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag caogtaccgt 600
 gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 660
 aaggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaa ccatctccaa agccaaaggg 720
 cagcccccag aaccacaggt gtacaacctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 780

445

194

29

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 840
gagagcaatg ggcagcogga gaacaactac aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac 900
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 960
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1020
tccctgtctc cgggtaaatg a 1041

<210> 32
<211> 461
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<400> 32

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Ala Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp

146

30

145

115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
130 135 140

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
145 150 155 160

Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
165 170 175

Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
180 185 190

Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
210 215 220

Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

31

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380

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

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

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

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 33

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<400> 33

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn

32

20

25

30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

149

33

148

Gly Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

150

34

149

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 34
<211> 438
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 34

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

35

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
225 230 235 240

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
245 250 255

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
260 265 270

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
275 280 285

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
290 295 300

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
305 310 315 320

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
325 330 335

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
340 345 350

152

36

131

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
355 360 365

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
370 375 380

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
385 390 395 400

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
405 410 415

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
420 425 430

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 35

<211> 346

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<400> 35

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

153

37

152

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
130 135 140

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
145 150 155 160

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
165 170 175

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
180 185 190

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
195 200 205

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
210 215 220

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
225 230 235 240

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
245 250 255

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
260 265 270

134

38

183

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
275 280 285

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
290 295 300

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
305 310 315 320

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
325 330 335

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345

<210> 36

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<400> 36

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

155

39

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
115 120 125

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
130 135 140

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
145 150 155 160

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
165 170 175

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
245 250 255

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
260 265 270

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

154

136

40

185

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
290 295 300

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 37
<211> 323
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<400> 37

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

157

41

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
115 120 125

156

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
130 135 140

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
145 150 155 160

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
165 170 175

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
195 200 205

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
210 215 220

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
225 230 235 240

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
245 250 255

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
260 265 270

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
290 295 300

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
305 310 315 320

150

42

Pro Gly Lys

157

<210> 38

<211> 210

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
1 5 10 15

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
35 40 45

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
50 55 60

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
65 70 75 80

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
85 90 95

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
100 105 110

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
115 120 125

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
130 135 140

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
145 150 155 160

139

43

158

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
165 170 175

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
180 185 190

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
195 200 205

Gly Lys
210

<210> 39
<211> 633
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
ccgtcagtc tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 60
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 120
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 180
agcacgtaco gtgtggtcag cgtctctacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 240
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccgccc ccacggagaa aaccatctcc 300
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacacc tgcacctc cggggtgag 360
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 420
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 480
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 540
cagcagggga acgtcttctc atgctcgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 600
cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa tga 633

<210> 40
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
115 120 125

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

161

160

195

200

205

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 41

<211> 663

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

ccgtgccag cacctgaact cctgggggga cgtcagttct tctcttccc cccaaaccc 60
 aaggacccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 120
 cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 180
 aagacaaagc cgcgggagga gcagtacac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 240
 gtcttcgacc aggactggct gaatggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaagcc 300
 ctcccagccc ccctcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagocccg agaaccacag 360
 gtgtaccccc tgccccctc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 420
 ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 480
 gagaacaact acaagacac gcctcccggt ctggactccg acgggtcctt cttctctac 540
 agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtttcttc atgctcgtg 600
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 660
 tga 663

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30

162
16T

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

163
162

47

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 44
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
20 25

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

International Application No
PCT/US2005/027694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/62 C07K14/705 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, ENBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/016229 A (WYETH; IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED; PITTMAN, DEBRA, D; CLANCY) 26 February 2004 (2004-02-26) page 1, lines 19-24 page 7, lines 3-16 page 12, lines 9-19 page 17, lines 10-17 page 33, line 6 - page 35, line 18 page 40, lines 13-17	1-58



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 December 2005

Date of mailing of the international search report

15/12/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 6818 Patentkan 8
NL - 6800 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-8040, Tx 31 691 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Barnas, C

164
163

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/027694

165
164

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29-58 (part)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 29-58 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/US2005/027694

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004016229 A	26-02-2004	AU 2003265505 A1	03-03-2004
		CA 2495663 A1	26-02-2004
		EP 1575513 A2	21-09-2005

166
165

167
163

PROTEÍNAS DE FUSION RAGE Y METODOS DE UTILIZACION
REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica prioridad bajo 35 USC 119(e) a partir de la solicitud de patente provisional Número de Serie No. 60/598.555 registrada en Agosto 3 de 2004. La divulgación de la solicitud de la patente provisional U.S. Número de Serie No. 60/598.555 se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

10 **CAMPO DEL INVENTO**

El presente invento se relaciona con la regulación del Receptor Productos Avanzados Glicosilados (RAGE). Más particularmente, el presente invento describe proteínas de fusión que comprenden un polipéptido RAGE, métodos para fabricar tales proteínas de fusiones, y el uso de tales proteínas para tratamiento de trastornos basados en RAGE.

15

FUNDAMENTO

La incubación de proteínas o lípidos con azúcares de aldosa resulta en glicación no enzimática y oxidación de grupos amino sobre proteínas para formar aductos de Amadori. Con el tiempo, los aductos soportan reordenamientos adicionales, deshidrataciones, y

20 eslabonamiento con otras proteínas para formar complejos conocidos como Productos Finales Avanzados Glicosilados (AGEs). Factores que promueven formación de AGEs incluyen degradación proteica retardada (ej., como en amiloidosis), acumulación de macromoléculas con alto contenido de lisina, y altos niveles de glucosa en sangre (ej., como en diabetes) (Hori., *J. Biol. Chem.* 270: 25752-761, (1995)). AGEs han sido implicados en una variedad de

25 trastornos incluyendo complicaciones asociadas con diabetes y envejecimiento normal.

AGEs presentan unión específica y saturable a receptores de superficie celular sobre monocitos, macrófagos, células endoteliales de la microvasculatura, células de músculo liso, células mesenquiales, y neuronas. El receptor para Productos Finales Avanzados Glicosilados (RAGE) es un miembro de la familia del supergen de las moléculas de inmunoglobulinas. El

30 dominio extracelular (N-terminal) de RAGE incluye tres regiones tipo inmunoglobulina: un dominio tipo-V (variable) seguido por dos dominios tipo-C (constante) (Neeper *J. Biol. Chem.*, 267: 14998-15004 (1992); Schmidt, *Circ. (Suppl.)* 96#194 (1997)). Un solo dominio que abarca transmembranalmente y una cola citosólica corta altamente cargada siguen el dominio extracelular. El dominio extracelular N-terminal se puede aislar mediante proteólisis

168
167

de RAGE o mediante enfoques biológicos moleculares para generar RAGE soluble (sRAGE) compuesto de los dominios V y C.

RAGE se expresa sobre múltiples tipos celulares incluyendo leucocitos, neuronas, células microgliales y endotelio vascular (ej., Hori, *J. Biol. Chem.*, 270:25752-761 (1995)).

- 5 Niveles aumentados de RAGE también son encontrados en tejidos en envejecimiento (Schleicher, *J. Clin. Invest.* 99(3): 457-468 (1997)), y la retina diabética, vasculatura y riñón (Schmidt, *Nature Med.*, 1:1002-1004 (1995)).

- Además de AGEs, otros compuestos pueden fijarse a y modular RAGE. RAGE se une a múltiples ligandos funcional y estructuralmente diversos incluyendo amiloide beta ($A\beta$),
10 amiloide sérica A (SAA), Productos Finales Avanzados Glicosilados (AGEs), S100 (un miembro proinflamatorio de la familia Calgranulina), lisina de carboximetilo (CML), anfoterita y CD11b/CD18 (Bucciarelli, *Cell Mol. Life Sci.*, 59: 1117-128 (2002); Chavakis, *Microbes Infect.*, 6:1219-1225 (2004); Kokkola, *Scand. J. Immunol.*, 61:1-9 (2005); Schmidt, *J. Clin. Invest.*, 108:949-955 (2001); Rocken, *Am. J. Pathol.*, 162:1213-1220
15 (2003)).

- Se ha mostrado que la unión de ligandos tales como AGEs, S100/calgranulina, β -amiloide, CML (N^{ϵ} -carboximetil lisina), y anfoterita a RAGE modifica la expresión de una variedad de genes. Luego estas interacciones pueden iniciar mecanismos de transducción de señales incluyendo activación p38, p21ras, quinasas MAP, fosforilación Erk1-2, y la
20 activación del mediador transcripcional de señalización inflamatoria, NF-kB (Yeh, *Diabetes*, 50:1495-1504 (2001)). Por ejemplo en muchos tipos celulares, la interacción entre RAGE y sus ligandos puede generar estrés oxidativo, lo cual a su vez resulta en activación del factor de transcripción sensitivo de radical libre NF-KB, y la activación de genes NF-kB-regulados, tal como las citoquinas IL-1 β y TNF-alfa. Además, la expresión RAGE es regulada en alta vía
25 NF-kB y muestra expresión aumentada en sitios de inflamación o estrés oxidativo (Tanaka, *J. Biol. Chem.*, 275:25781-25790 (2000)). Por lo tanto, un espiral ascendente y a menudo perjudicial puede impulsarse por una retroalimentación positiva iniciado por unión de ligando.

- La activación de RAGE en diferentes tejidos y órganos puede llevar a un número de consecuencias patofisiológicas. RAGE ha sido implicado en una variedad de condiciones
30 incluyendo: inflamación aguda y crónica (Hofmann, *Cell* 97: 889-901 (1999)), el desarrollo de complicaciones tardías diabéticas tales como permeabilidad vascular aumentada (Wautier, *J. Clin. Invest.*, 107:238-243 (1995)), neuropatía (Teillet, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11:1488-1497 (2000)), arteriosclerosis (Vlassara, *The Finnish Medical Society DUODECIM, Ann. Med.*,

169
~~168~~

28:419-426(1996)), y retinopatía (Hammes, *Diabetología*, 42:603-607 (1999). RAGE también ha sido implicado en la enfermedad de Alzheimer (Yan, *Nature*, 382:685-691 (1996)), y en invasión tumoral y metástasis (Taguchi, *Nature*, 405:354-357 (2000)).

5 A pesar de la amplia expresión de RAGE y su rol pleiotrópico aparente en múltiples modelos patológicos, RAGE no parece ser esencial para el desarrollo normal. Por ejemplo, ratones KO que expresan RAGE no tienen un fenotipo anormal evidente, indicando que mientras RAGE puede jugar un rol en la patología cuando se estimula de manera crónica, la inhibición de RAGE no parece contribuir a ningún fenotipo agudo indeseado (Liliensiek, *J. Clin. Invest.*, 113:1641-50 (2004)).

10 Antagonizando la unión de ligandos fisiológicos a RAGE puede regular de manera negativa los cambios patofisiológicos originados por concentraciones excesivas de AGEs y otros ligandos RAGE. Al reducir la unión de ligandos endógenos a RAGE, los síntomas asociados con trastornos mediados por RAGE se pueden reducir. RAGE soluble (sRAGE) es capaz de antagonizar de manera efectiva la unión de ligandos RAGE a RAGE. Sin embargo, sRAGE puede tener una vida media cuando se administra en vivo que puede ser demasiado
15 corta para ser terapéuticamente útil para uno o más trastornos. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar compuestos que antagonicen la unión de AGEs y otros ligandos fisiológicos al receptor RAGE donde el compuesto tiene un perfil farmacocinético deseable.

20 RESUMEN

Las realizaciones del presente invento comprenden proteínas de fusión RAGE y métodos para utilizar tales proteínas. El presente invento puede ser realizado en una variedad de formas. Las realizaciones del presente invento pueden comprender una proteína de fusión que comprende un polipéptido RAGE ligado a un segundo polipéptido no RAGE. En una
25 realización, la proteína de fusión comprende un sitio de unión de ligandos RAGE. La proteína de fusión puede comprender adicionalmente un polipéptido RAGE directamente ligado a un polipéptido que comprende dominio CH2 de inmunoglobulina, o una porción del dominio CH2.

El presente invento también comprende un método para preparar una proteína de fusión RAGE. En una realización el método comprende unir un polipéptido RAGE a un
30 segundo polipéptido no RAGE. En una realización, el polipéptido RAGE comprende un sitio de unión de ligando RAGE. El método puede comprender unir un polipéptido RAGE directamente a un polipéptido comprendiendo el dominio CH2 de una inmunoglobulina o una porción del dominio CH2.

170.
169

En otras realizaciones, el presente invento puede comprender métodos y composiciones para tratar un trastorno mediado por RAGE en un sujeto. El método puede comprender administrar una proteína de fusión del presente invento al sujeto. La composición puede comprender una proteína de fusión RAGE del presente invento en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Hay varias ventajas que se pueden asociar con realizaciones particulares del presente invento. En una realización, las proteínas de fusión del presente invento pueden ser metabolitamente estables cuando se administran a un sujeto. También, las proteínas de fusión del presente invento pueden exhibir unión de alta afinidad para ligandos RAGE. En ciertas realizaciones, las proteínas de fusión del presente invento se fijan a ligandos RAGE con afinidades en el rango de nanomolar alto a micromolar bajo. Al unirse con alta afinidad a ligandos RAGE fisiológicos, las proteínas de fusión del presente invento se pueden utilizar para inhibir unión de ligandos endógenos a RAGE, proporcionando así un medio para aliviar enfermedades mediadas por RAGE.

También, las proteínas de fusión del presente invento se pueden proporcionar en forma de proteína o ácido nucleico. En una realización de ejemplo, la proteína de fusión se puede administrar sistemáticamente y permanecer en la vasculatura para tratar potencialmente enfermedades mediadas en parte por RAGE. En otra realización de ejemplo, la proteína de fusión se puede administrar de manera local para tratar enfermedades donde los ligandos RAGE contribuyen a la patología de la enfermedad. Alternativamente, un constructo de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión puede ser liberado a un sitio mediante el uso de un vehículo apropiado tal como un virus o ADN desnudo donde la expresión local temporal puede inhibir localmente la interacción entre ligandos RAGE y receptores. Por lo tanto, la administración puede ser temporal (ej., como donde la proteína de fusión es administrada) o más permanente en naturaleza (ej., como donde la proteína de fusión es administrada como un ADN recombinante).

Existen características adicionales del invento que serán descritas más adelante. Se debe entender que el invento no está limitado en su solicitud a los detalles establecidos en las siguientes reivindicaciones, descripción y figuras. El invento es capaz de otras realizaciones y de ser practicado o realizado en varias formas.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Varias características, aspectos y ventajas del presente invento se harán más manifiestos con referencia a las siguientes figuras.

171
170

La fig. 1 muestra varias secuencias RAGE según realizaciones alternas del presente invento: Panel A, SEQ ID NO: 1, la secuencia aminoácida para RAGE humano; y SEQ ID NO: 2, la secuencia aminoácida para RAGE humano sin la secuencia de señal de aminoácidos 1-22; Panel B, SEQ ID NO:3, la secuencia aminoácida para RAGE humano sin la secuencia de señal de aminoácidos 1-23; Panel C, SEQ ID NO:4, la secuencia aminoácida de sRAGE humano; SEQ ID NO:5, la secuencia aminoácida de sRAGE humano sin la secuencia de señal de aminoácidos 1-22, y SEQ ID NO:6, la secuencia aminoácida de sRAGE humano sin la secuencia de señal de aminoácidos 1-23; Panel D, SEQ ID NO: 7, una secuencia aminoácida que comprende el dominio-V de RAGE humano; SEQ ID NO: 8, una secuencia aminoácida alterna que comprende el dominio V de RAGE humano; SEQ ID NO: 9, un fragmento N-terminal del dominio-V de RAGE humano; SEQ ID NO: 10, un fragmento N-terminal alterno del dominio-V de RAGE humano; SEQ ID NO: 11, la secuencia aminoácida para aminoácidos 124-221 de RAGE humano; SEQ ID NO: 12, la secuencia aminoácida para aminoácidos 227-317 de RAGE humano; SEQ ID NO: 13, la secuencia aminoácida para aminoácidos 23-123 de RAGE humano; Panel E, SEQ ID NO: 14, la secuencia aminoácida para aminoácidos 24-123 de RAGE humano; SEQ ID NO: 15, la secuencia aminoácida para aminoácidos 23-136 de RAGE humano; SEQ ID NO: 16, la secuencia aminoácida para aminoácidos 24-136 de RAGE humano; SEQ ID NO: 17, la secuencia aminoácida para aminoácidos 23-226 de RAGE humano; SEQ ID NO: 18, la secuencia aminoácida para aminoácidos 24-226 de RAGE humano; Panel F, SEQ ID NO: 19, la secuencia aminoácida para aminoácidos 23-251 de RAGE humano; SEQ ID NO: 20, la secuencia aminoácida para aminoácidos 24-251 de RAGE humano; SEQ ID NO: 21, un enlazador de interdominio RAGE; SEQ ID NO:22, un segundo enlazador de interdominio RAGE; SEQ ID NO: 23, un tercer enlazador de interdominio RAGE; SEQ ID NO: 24, un cuarto enlazador de interdominio RAGE; Panel G, SEQ ID NO: 25, ADN que codifica aminoácidos RAGE humano 1-118; SEQ ID NO: 26, ADN que codifica aminoácidos RAGE humano 1-123; y SEQ ID NO: 27, ADN que codifica aminoácidos RAGE humano 1-136; Panel H, SEQ ID NO: 28, ADN que codifica aminoácidos RAGE humano 1-230; y SEQ ID NO: 29, ADN que codifica aminoácidos RAGE humano 1-251; Panel I, SEQ ID NO: 38, una secuencia aminoácida parcial para los dominios CH2 y CH3 de IgG humano; SEQ ID NO: 39, ADN que codifica una porción de los dominios CH2 y CH3 humanos de IgG humano; SEQ ID NO: 40, una secuencia aminoácida para los dominios CH2 y CH3 de IgG humano; Panel J, SEQ ID NO: 41, un ADN que codifica los dominios CH2 y CH3 humanos de IgG humano; SEQ ID NO:42, una secuencia aminoácida para el dominio CH2 de IgG humano; SEQ ID NO: 43, una

secuencia aminoácida para el dominio CH3 de IgG humano; SEQ ID NO: 44, un quinto enlazador de interdominio RAGE.

La Fig 2 muestra la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 30) de una región codificadora de una proteína de fusión RAGE (TTP-4000) según una realización del presente invento. La secuencia codificadora 1-753 resaltada en negrilla codifica la secuencia de proteína N-terminal RAGE mientras la secuencia 754-1386 codifica la secuencia proteica de IgG Fc (γ 1) humano.

La fig. 3 muestra la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 31) de una región codificadora de proteína de fusión RAGE (TTP-3000) según una realización del presente invento. La secuencia codificadora 1-408 resaltada en negrilla codifica la secuencia de proteínas N-terminal RAGE, mientras la secuencia 409-1041 codifica la secuencia proteica IgG Fc(γ 1) humano.

La fig. 5 muestra las secuencias aminoácidas, SEQ ID NO: 35 (TTP-3000), SEQ ID NO: 36, y SEQ ID NO:37, en donde cada una codifica una proteína de fusión RAGE de tres dominios según realizaciones alternas del presente invento. La secuencia RAGE es resaltada con negrilla.

La Fig. 6, Panel A, muestra una comparación de los dominios proteicos en proteína RAGE humana y proteína Ig gama-1 FC humana, y puntos de escisión utilizados para preparar TTP-3000 (en la posición 136) y TTP-4000 (en la posición 251) según realizaciones alternas del presente invento; y el Panel B muestra la estructura de dominio para TTP-3000 y TTP-4000 según realizaciones alternas del presente invento.

La Fig. 7 muestra resultados de un ensayo de unión *in Vitro* para proteínas de fusión sRAGE, y RAGE TTP-4000 (TT4) y TTP-3000 (TT3), a los ligandos RAGE beta-amiloide (A-beta), S100b(S100), y anfoterina (Ampho), según una realización del presente invento.

La Fig. 8 muestra los resultados de un ensayo de unión *in Vitro* para la proteína de fusión RAGE TTP-4000 (TT4) ("Proteína") a amiloide-beta en comparación con un control negativo que incluye solamente los reactivos de inmunodetección ("Complejo Solo"), y antagonismo de tal unión mediante un antagonista RAGE ("Ligando RAGE") según una realización del presente invento.

La Fig. 9 muestra los resultados de un ensayo de unión *in Vitro* para proteína de fusión RAGE TTP-3000 (TT3) ("Proteína") a amiloide-beta en comparación con un control negativo solamente incluyendo los reactivos de inmunodetección ("Complejo Solo"), y antagonismo de tal unión mediante un antagonista RAGE ("Ligando RAGE") según una realización del presente invento.

173
175

La Fig. 10 muestra los resultados de un ensayo basado en células que mide la inhibición de la producción inducida por S100b-RAGE de TNF-alfa mediante proteínas de fusión RAGE TTP-300 (TT3) y TTP-4000 (TT4), y sRAGE según una realización del presente invento.

5 La Fig. 11 muestra un perfil farmacocinético para la proteína de fusión RAGE TTP-4000 según una realización del presente invento donde cada curva representa un animal diferente bajo las mismas condiciones experimentales.

La Fig. 12 muestra niveles relativos de liberación TNF- α a partir de células THP-1 debido a estimulación mediante la proteína de fusión RAGE TTP-4000 y estimulación IgG humano como una medida de una respuesta inflamatoria según una realización del presente invento.

La Fig. 13 muestra el uso de la proteína de fusión RAGE TTP-4000 para reducir restenosis en animales diabéticos según realizaciones alternas del presente invento, en donde el panel A muestra que la proteína de fusión RAGE TTP-4000 redujo la relación intima/media en comparación con un control negativo (IgG), y el panel B muestra que la proteína de fusión RAGE TTP-4000 redujo la proliferación de células de músculo liso en una manera sensible a dosis.

La Fig. 14 muestra el uso de la proteína de fusión RAGE TTP-4000 para reducir formación amiloide y disfunción cognitiva en animales con Enfermedad de Alzheimer (AD) según realizaciones alternas en donde el panel A muestra que la proteína de fusión RAGE TTP-4000 redujo la carga amiloide en el cerebro, y el panel B muestra que la proteína de fusión RAGE TTP-4000 mejoró la función cognitiva.

La Fig. 15 muestra curvas de saturación-unión con TTP-4000n a varios ligandos RAGE conocidos inmovilizados según una realización del presente invento.

25

DESCRIPCION DETALLADA

Para propósitos de esta especificación, a menos que se indique lo contrario, todos los numeros que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, y otros utilizados en esta especificación se deben entender como modificados en todas las instancias por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros números establecidos en la siguiente especificación son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas buscadas ser obtenidas por el presente invento. Al menos, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe ser al menos

interpretado a la luz del número de dígitos significativos reportados y mediante aplicación de técnicas de redondeo comunes.

A pesar de que los rangos numéricos y parámetros que establecen el amplio alcance del invento son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos
5 específicos son reportados lo más precisos posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, inherentemente contiene ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba. Además, todos los rangos divulgados en la presente se debe entender incluyen cualquiera y todos los subrangos incluidos en la misma. Por ejemplo, un rango declarado de "1 a 10" se debe considerar incluye cualquiera y todos los
10 subrangos entre (e inclusive de) el valor mínimo de 1 y el valor máximo de 10; es decir; todos los subrangos que comienzan con un valor mínimo de 1 o más, ej., 1 a 6.1, y terminan con un valor máximo de 10 o menos, ej., 5.5 a 10. Adicionalmente, cualquier referencia citada como "incorporada en la presente" se entenderá como incorporada en su totalidad.

Adicionalmente se nota que, como se utiliza en esta especificación, las formas
15 singulares "un," "uno" y "el" incluyen referentes plurales a menos que expresamente e inequívocamente se limiten a un referente. El término "o" se utiliza de manera intercambiable con el término "y/o" a menos que el contexto claramente indique lo contrario.

También, los términos "porción" y "fragmento" se utilizan de manera intercambiable para referirse a partes de un polipéptido, ácido nucleico, u otro constructo molecular.

20 Como se utiliza en la presente, el término "corriente arriba" se refiere a un residuo que es N-terminal a un segundo residuo donde la molécula es una proteína, o 5' a un segundo residuo donde la molécula es un ácido nucleico. También como se utiliza en la presente, el término "corriente abajo" se refiere a un residuo que es C-terminal a un segundo residuo donde la molécula es una proteína, o 3' a un segundo residuo donde la molécula es un ácido
25 nucleico.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como comúnmente lo entiende alguien de habilidad común en el estado de la técnica. Los médicos particularmente son dirigidos a Protocolos
30 Actuales en Biología Molecular (Ansubel) para definiciones y términos del estado de la técnica. Las abreviaturas para residuos aminoácidos son los códigos estándares de 3 letras y/o 1 letra utilizados en el estado de la técnica para referirse a uno de los 20 aminoácidos L-comunes.

Un "ácido nucleico" es un polinucleótido tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). El término se utiliza para incluir ácidos nucleicos de hebra simple,

175
134
ácidos nucleicos de hebra doble, y ARN y ADN hechos de análogos nucleótidos o nucleosidos.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se puede utilizar para transportar una segunda molécula de ácido nucleico hacia una célula. En una realización, 5 En una realización, el vector tiene en cuenta la replicación de secuencias de ADN insertadas en el vector. El vector puede comprender un promotor para mejorar la expresión de la molécula de ácido nucleico en al menos algunas células huésped. Los vectores se pueden replicar de manera autónoma (extracromosomal) o pueden estar integrados en un cromosoma de célula huésped. En una realización, El vector puede comprender un vector de expresión 10 capaz de producir una proteína derivada de al menos parte de una secuencia de ácido nucleico insertada en el vector.

Como se conoce en el estado de la técnica, las condiciones para hibridizar secuencias de ácido nucleico entre sí pueden ser descritas en oscilar entre una baja y alta exactitud. Generalmente, condiciones de hibridización altamente severas se refieren a lavar híbridos en 15 buffer de baja salinidad a altas temperaturas. La hibridización puede ser para filtrar ADN ligado utilizando soluciones de hibridización estándares en el estado de la técnica tales como 0.5M NaHPO₄, dodecilsulfato sódico al 7% (SDS), a 65°C, y lavar en 0.25 M NaHPO₄, SDS al 3.5% seguido por lavado 0.1 x SSC/0.1% SDS a temperatura en el rango entre temperatura ambiente y 68°C dependiendo de la longitud de la sonda (ver ej., Ausubel, F.M. *Protocolos* 20 *Cortos en Biología Molecular*, Cuarta Edición, Capítulo 2, John Wiley & Sons, N.Y). Por ejemplo un lavado de alta exactitud comprende lavado en SSC 6x/pirofosfato de sodio al 0.05% a 37°C para una sonda oligonucleotida de 14 bases, o 48°C para una sonda oligonucleotida base 17, o a 55°C para una sonda oligonucleotida de 20 bases, o a 60°C para una sonda oligonucleotida de 25 bases, o a 65°C para una sonda nucleotida de 25 25 aproximadamente 250 nucleótidos de longitud. Las sondas de ácido nucleico se pueden rotular con radionucleótidos mediante rotulado final con, por ejemplo, [γ -³²P]ATP, o incorporación de nucleótidos radiorotulados tal como [α -³²P]dCTP mediante rotulación aleatoria de cebadores. Alternativamente, las sondas se pueden rotular mediante incorporación de nucleótidos biotinilados o de fluoresceína, y la sonda detectada utilizando Streptavidina o 30 anticuerpos anti-fluoresceína.

Como se utiliza en la presente, "moléculas orgánicas pequeñas" son moléculas de peso molecular menor de 2.000 Daltons que contienen al menos un átomo de carbono.

"Polipéptido" y "proteína" se utilizan intercambiabilmente en la presente para describir moléculas proteicas que pueden comprender proteínas de longitud parcial o total.

176.
175

El término "proteína de fusión" se refiere a una proteína o polipéptido que tiene una secuencia aminoácida derivada de dos o más proteínas. La proteína de fusión también puede incluir regiones de unión de aminoácidos entre porciones aminoácidos derivadas de proteínas separadas.

5 Como se utiliza en la presente, un "polipéptido no-RAGE" es cualquier polipéptido que no se deriva de RAGE o un fragmento del mismo. Tales polipéptidos no RAGE incluyen péptidos de inmunoglobulina, polipéptidos dimerizados, polipéptidos estabilizantes, péptidos anfifílicos, o polipéptidos comprendiendo secuencia aminoácidas que proporcionan "etiquetas" para localización o purificación de la proteína.

10 Como se utiliza en la presente, "péptidos de inmunoglobulina" pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma. En una realización, la porción de la cadena pesada puede ser el fragmento Fc o una porción del mismo. Como se utiliza en la presente, el fragmento Fc comprende el polipéptido de bisagra de cadena pesada, y los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de una inmunoglobulina, en cualquier forma
15 monomérica o dimérica. O, el fragmento CH1 y Fc se puede utilizar como el polipéptido de inmunoglobulina. La cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar a partir de cualquiera de los isótopos de cadena pesada conocidos: IgG (γ), IgM(γ), IgM(μ), IgD(δ), IgE (ϵ), o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar a partir de cualquiera de los subtipos de cadena pesada conocidos: IgG1(γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4
20 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. Un ejemplo de actividad biológica que se puede alterar incluye la reducción de una capacidad de isotipo para fijarse a algunos receptores Fc como por ejemplo, mediante modificación de la región de bisagra.

Los términos "identidad" o "porcentaje idéntico" se refieren a la identidad de
25 secuencia entre dos secuencias aminoácidos o entre dos secuencia de ácido nucleico. El porcentaje de identidad se puede determinar al alinear dos secuencias y se refiere al número de residuos idénticos (*es decir*, aminoácido o nucleotido) en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. La alineación y comparación de secuencias se puede realizar utilizando los algoritmos estándares en el estado de la técnica (ej., Smith y Waterman, 1981,
30 *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85:2444) o mediante versiones computarizadas de estos algoritmos (Paquete de Software Wisconsin Genetics Versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI) públicamente disponible como BLAST Y FASTA.

177.

126

También, ENTREZ, disponible a través de los Institutos Nacionales de Salud, Bethesda MD, se puede utilizar para comparación de secuencias. En una realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias se puede determinar utilizando GCG con un peso de gap de 1, tal que cada gap aminoácido es ponderado como si fuera una sola desigualdad de aminoácidos entre las dos secuencias.

Como se utiliza en la presente, el término “residuos conservados” se refiere a aminoácidos que son iguales entre una pluralidad de proteínas que tienen la misma estructura y/o función. Una región de residuos conservados puede ser importante para estructura o función de proteínas. Por lo tanto, residuos conservados contiguos como se identificaron en una proteína tri-dimensional pueden ser importante para función o estructura de proteínas. Para encontrar residuos conservados, o regiones conservadas de estructura 3-D, se puede realizar una comparación de secuencias para proteínas iguales o similares a partir de diferentes especies, o de individuos de la misma especie.

Como se utiliza en la presente, el término “homólogo” significa un polipéptido que tiene un grado de homología con la secuencia aminoácida tipo silvestre. Las comparaciones de homología se pueden realizar al ojo, o más usualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas de computador comercialmente disponibles pueden calcular el porcentaje de homología entre dos o más secuencias (ej., Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:726-730). Por ejemplo, las secuencias homologas pueden ser tomadas para incluir una secuencia aminoácida la cual en realizaciones alternas son al menos 75% idénticas, 85% idénticas, 90% idénticas, 95% idénticas, o 98% idénticas entre sí.

Como se utiliza en la presente, un “dominio” de polipéptido o proteína comprende una región a lo largo de un polipéptido o proteína que comprende una unidad independiente. Los dominios se pueden definir en términos de estructura, secuencia y/o actividad biológica. En una realización, un dominio polipéptido puede comprender una región de una proteína que se dobla en una forma que es sustancialmente independiente del resto de la proteína. Los dominios se pueden identificar utilizando bases de datos de dominios tales como, pero sin limitar a PFAM, PRODOM, PROSITE, BLOCKS, PRINTS, SBASE, ISREC, PROFILES, SAMRT, y PROCLASS.

Como se utiliza en la presente, “dominio de inmunoglobulina” es una secuencia de aminoácidos que es estructuralmente homóloga, o idéntica a, un dominio de una inmunoglobulina. La longitud de la secuencia de aminoácidos de un dominio de inmunoglobulina puede ser de cualquier longitud. En una realización, un dominio de

inmunoglobulina puede ser menor de 250 aminoácidos. En una realización de ejemplo, un dominio de inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 80-150 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, la región variable, y las regiones CH1, CH2, y CH3 de IgG son cada una dominios de inmunoglobulina. En otro ejemplo, la variable, las regiones CH1, CH2, CH3 y CH4 de un IgM son cada una dominios de inmunoglobulina.

178

177

Como se utiliza en la presente, un “dominio de inmunoglobulina RAGE” es una secuencia de aminoácidos a partir de la proteína RAGE que es estructuralmente homogénea, o idéntica a, un dominio de una inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio de inmunoglobulina RAGE puede comprender el dominio –V RAGE, el dominio 1 clase C2 tipo Ig RAGE (“dominio C1”), o el dominio 2 clase C2 tipo Ig RAGE (“dominio C2”).

Como se utiliza en la presente, un “enlazador de interdominio” comprende un polipéptido que une dos dominios juntos. Una región de bisagra Fc es un ejemplo de un enlazador de interdominio en un IgG.

Como se utiliza en la presente, “directamente enlazado” identifica un enlace covalente entre dos grupos diferentes (ej., secuencias de ácido nucleico, polipéptidos, dominios polipéptidos) que no tienen ningún átomo interpuesto entre los dos grupos que están siendo unidos.

Como se utiliza en la presente, “dominio fijador o unidor de ligandos” se refiere a un dominio de una proteína responsable de unir un ligando. El término dominio de unión de ligandos incluye homólogos de un dominio de unión de ligandos o porciones de los mismos. En cuanto a esto, se pueden hacer sustituciones aminoácidos deliberadas en el sitio de unión de ligandos sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, o hidrofiliidad de los residuos, siempre y cuando la especificidad de unión del dominio de unión de ligandos sea retenida.

Como se utiliza en la presente, un “sitio de unión de ligandos” comprende residuos en una proteína que directamente interactúan con un ligando, o residuos involucrados en posicionar el ligando en estrecha proximidad a aquellos residuos que directamente interactúan con un ligando. La interacción de residuos en el sitio de unión de ligandos se puede definir por la proximidad espacial de los residuos a un ligando en el modelo o estructura. El término sitio de unión de ligandos incluye homólogos de un sitio de unión de ligandos, o porciones del mismo. En cuanto a esto, se pueden hacer sustituciones aminoácidos deliberadas en el sitio de unión de ligandos sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, o hidrofiliidad de los residuos, siempre y cuando la especificidad de unión del dominio de

179

unión de ligandos sea retenida. Un sitio de unión de ligandos puede existir en uno o más dominios de unión de ligandos de una proteína o polipéptido.

Como se utiliza en la presente, el término “interactuar” se refiere a una condición de proximidad entre un ligando o compuesto, o porciones o fragmentos de los mismos, y una porción de una segunda molécula de interés. La interacción puede ser no covalente, por ejemplo, como resultado de enlaces de hidrógeno, interacciones van der Waals, o interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, o ésta puede ser covalente.

178

Como se utiliza en la presente, un “ligando” se refiere a una molécula o compuesto o entidad que interactúa con un sitio de unión de ligandos, incluyendo sustratos o análogos o partes de los mismos. Como se describe en la presente, el término “ligando” puede referirse a compuestos que se fijan a la proteína de interés. Un ligando puede ser un agonista, un antagonista, o un modulador. O, un ligando puede no tener un efecto biológico. O, un ligando puede bloquear la unión de otros ligando inhibiendo así un efecto biológico. Los ligandos pueden incluir, pero no están limitados a inhibidores de moléculas pequeñas. Estas moléculas pequeñas pueden incluir péptidos, péptidomiméticos, o compuestos orgánicos y similares. Los ligandos también pueden incluir polipéptidos y/o proteínas.

Como se utiliza en la presente, un “compuesto modulador” se refiere a una molécula la cual cambia o altera la actividad biológica de una molécula de interés. Un compuesto modulador puede aumentar o disminuir actividad, o cambiar las características físicas o químicas, o propiedades funcionales o inmunológicas, de la molécula de interés. Para RAGE, un compuesto modular puede aumentar o disminuir actividad, o cambiar las características, o propiedades funcionales o inmunológicas del RAGE, o una porción del mismo. Un compuesto modular puede incluir péptidos naturales y/o químicamente sintetizados o péptidos artificiales, péptidos modificados (ej., fosfopéptidos), anticuerpos, carbohidratos, monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, glicolípidos, compuestos heterocíclicos, nucleosidos o nucleótidos o partes de los mismos, y moléculas orgánicas pequeñas o inorgánicas. Un compuesto modular puede ser un compuesto fisiológico endógeno o puede ser un compuesto natural o sintético. O, el compuesto modular puede ser una molécula orgánica pequeña. El término “compuesto modulador” también incluye un ligando químicamente modificado o compuesto, e incluye isómeros y formas racémicas.

Un “agonista” comprende un compuesto que se fija a un receptor para formar un complejo que produce una respuesta farmacológica específica al receptor involucrado.

Un "antagonista" comprende un compuesto que se fija a un agonista o a un receptor para formar un complejo que no da origen a una respuesta farmacológica sustancial y puede inhibir la respuesta biológica inducida por un agonista.

Los agonistas RAGE por lo tanto se pueden unir a RAGE y estimular procesos celular mediados por RAGE, y los antagonistas RAGE pueden inhibir procesos mediados por RAGE a partir de ser estimulados por un agonista RAGE. Por ejemplo, en una realización, el proceso celular estimulado por agonistas RAGE comprende activación de transcripción del gen TNF- α .

El término "miméticos peptídicos" se refiere a estructuras que sirven como substitutos para péptidos en interacciones entre moléculas (Morgan, 1989, *Ann. Reports Med. Chem.*, 24:243-252). Los miméticos peptídicos pueden incluir estructuras sintéticas que pueden o no contener aminoácidos y/o enlaces péptidos pero que retienen las características estructurales y funcionales de un péptido, o agonista, o antagonista. Los miméticos peptídicos también incluyen peptoides, oligopeptoides (Simon, 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:9367); y librearías peptídicas que contienen péptidos de una longitud diseñada que representan todas las secuencias posibles de aminoácidos correspondientes a un péptido, o agonista o antagonista del invento.

El término "tratar" se refiere a mejorar un síntoma de una enfermedad o trastorno y puede comprender curación del trastorno, sustancialmente evitando el comienzo del trastorno, o mejorando la condición del sujeto. El término "tratamiento" como se utiliza en la presente, se refiere a el espectro completo de tratamientos para un trastorno dado que el paciente esté padeciendo, incluyendo alivio de un síntoma o la mayoría de los síntomas que resultan de ese trastorno, una cura para el trastorno particular, o prevención del comienzo del trastorno.

Como se utiliza en la presente, el término "EC50" se define como la concentración de un agente que resulta en 50% de un efecto biológico medido. Por ejemplo, el EC50 de un agente terapéutica que tiene un efecto biológico medible puede comprender el valor al cual el agente presenta 50% del efecto biológico.

Como se utiliza en la presente, el término "IC50" se define como la concentración de un agente que resulta en inhibición del 50% de un efecto medido. Por ejemplo, el IC50 de un antagonista de unión RAGE puede comprender el valor al cual el antagonista reduce unión de ligandos al sitio de unión de ligando de RAGE en 50%.

Como se utiliza en la presente, una "cantidad efectiva" significa la cantidad de un agente que es efectivo para producir un efecto deseado en un sujeto. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" denota aquella cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que

181
186

producirá la respuesta terapéutica buscada en un animal o humano. La dosis actual que comprende la cantidad efectiva puede depender de la ruta de administración, el tamaño y salud del sujeto, el trastorno tratado, y similares.

5 El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” como se utiliza en la presente puede referirse a compuestos y composiciones que son apropiados para utilizar en sujetos humanos y animales, como por ejemplo, para composiciones terapéuticas administradas para el tratamiento de un trastorno o enfermedad mediado por RAGE.

10 El término “composición farmacéutica” se utiliza en la presente para denotar una composición que se puede administrar a un huésped mamífero, ej., de manera oral, parenteral, tópica, por inhalación, atomización, de manera intranasal, o racial, en formulaciones de dosificación unitaria conteniendo vehículos no tóxicos convencionales, diluyentes, adyuvantes, vehículos y similares.

15 El término “parenteral” como se utiliza en la presente, incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramuscular, inyección intracisternal, o técnicas de infusión.

Proteínas de Fusión RAGE

Las realizaciones del presente invento comprenden proteínas de fusión RAGE, métodos para la fabricación de tales proteínas, y métodos de uso de tales proteínas de fusión. El presente invento se puede realizar en una variedad de formas.

20 Por ejemplo, las realizaciones del presente invento proporcionan proteínas de fusión que comprenden un polipéptido RAGE ligado a un segundo polipéptido no RAGE. En una realización, la proteína de fusión puede comprender un sitio de unión de ligandos RAGE. En una realización, el sitio de unión de ligandos comprende el dominio más N-terminal de la proteína de fusión. El sitio de unión de ligandos RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión de ligandos RAGE
25 comprende SEQ ID NO:9 o una secuencia 90% idéntica a la misma.

En una realización, el polipéptido RAGE puede estar unido a un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción (ej., un fragmento del mismo) de un dominio de inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido que comprende un
30 dominio de inmunoglobulina comprende al menos una porción de al menos uno de los dominios CH2 o CH3 de un IgG humano.

Una proteína RAGE o polipéptido puede comprender una proteína RAGE humana de longitud completa (ej., SEQ ID NO: 1), o un fragmento de RAGE humano. Como se utiliza en la presente, un fragmento de un polipéptido RAGE tiene al menos 5 aminoácidos de longitud,

182
181

puede tener más de 30 aminoácidos de longitud, pero es menor que la secuencia aminoácida completa. En realizaciones alternas, el polipéptido RAGE puede comprender una secuencia que es 70%, o 80%, o 85%, o 90% idéntica a RAGE humano, o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido RAGE puede comprender RAGE humano, o un
5 fragmento del mismo, con Glicina como el primer residuo en cambio de Metionina (ver, ej., Beeper, (1992)). O, RAGE humano puede comprender RAGE de longitud completa con la secuencia de señal removida (ej., SEQ ID NO: 2 o SEQ NO:3) (Figs 1A y 1B) o una porción de esa secuencia aminoácida.

Las proteínas de fusión del presente invento también pueden comprender sRAGE (ej.,
10 SEQ ID NO:4), un polipéptido 90% idéntico a sRAGE, o un fragmento de sRAGE. Como se utiliza en la presente, sRAGE es la proteína RAGE que no incluye la región de transmembrana o la cola citoplásmico (Park, *Nature Med.*, 4:1025-1031 (1998)). Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender sRAGE humano, o un fragmento del mismo, con Glicina como el primer residuo en cambio de Metionina (Ver ej., Beeper (1992)). O, un
15 polipéptido RAGE puede comprender sRAGE humano con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO:6) (Fig. 1C) o una porción de esa secuencia aminoácida.

En otras realizaciones, la proteína RAGE puede comprender un dominio RAGE V (ej., SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO: 8; FIG. 1D) (Beeper, (1992); Smitd (1997)). O, una secuencia 90% idéntica al dominio RAGE V o un fragmento de la misma se puede utilizar.

20 O, la proteína RAGE puede comprender un fragmento del dominio RAGE V (ej., SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, Fig. 1D). En una realización la proteína RAGE puede comprender un sitio de unión de ligandos. En una realización, el sitio de unión de ligandos puede comprender SEQ ID NO: 9, o una secuencia 90% idéntica a la misma, o SEQ ID NO: 10, o una secuencia 90% idéntica a la misma. En aún otra realización, el fragmento RAGE es
25 un péptido sintético.

Por lo tanto, el polipéptido RAGE utilizado en las proteínas de fusión del presente invento puede comprender un fragmento de RAGE de longitud completa. Como se conoce en el estado de la técnica, RAGE comprende tres dominios polipéptidos tipo inmunoglobulina, el dominio V, y los dominios C1 y C2 cada uno unidos entre sí por un enlazador interdominios.
30 RAGE de longitud completa también incluye un polipéptido de transmembrana y una cola citoplásmica corriente abajo (C-terminal) del dominio C2, y enlazada al dominio C2.

En una realización, el polipéptido RAGE no incluye residuos de secuencia de señal. La secuencia de señal de RAGE puede comprender cualquiera de los residuos 1-22 o residuos 1-23 de RAGE de longitud total.

Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender aminoácidos 23-116 de RAGE humano (SEQ ID NO:7) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o aminoácidos 24-116 de RAGE humana (SEQ ID NO: 8) o una secuencia 90% idéntica a la misma, correspondiendo al dominio V de RAGE. O, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 124-221

5 de RAGE humano (SEQ ID NO: 11) o una secuencia 90% idéntica a la misma, correspondiendo al dominio C1 de RAGE. En otra realización, el polipéptido RAGE puede comprender aminoácidos 227-317 de RAGE (SEQ ID NO: 12) o una secuencia 90% idéntica a la misma, correspondiendo al dominio C2 de RAGE. O, el polipéptido RAGE puede comprende aminoácidos 23-123 de RAGE humano (SEQ ID NO: 13) o una secuencia 90%

10 idéntica a la misma, o aminoácidos 24-123 de RAGE humano (SEQ ID NO: 14) o una secuencia 90% idéntica a la misma, correspondiendo al dominio V de RAGE y un enlazador de interdominio corriente abajo. O, el polipéptido RAGE puede comprender aminoácidos 23-226 de RAGE humana (SEQ ID NO:17) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o 24-226 de RAGE humano (SEQ ID NO: 18) o una secuencia 90% idéntica a la misma,

15 correspondiendo al dominio V, El dominio C1 y el enlazador de interdominio uniendo estos dos dominios. O, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 5) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o 24-339 de RAGE humano (SEQ ID NO:6) o una secuencia 90% idéntica a la misma, correspondiendo a sRAGE (es decir, codificando los dominios V, C1, y C2 y los enlazadores de interdominio). O se

20 pueden utilizar fragmentos de cada una de estas secuencias.

La proteína de fusión puede incluir varios tipos de péptidos que no son derivados de RAGE o un fragmento del mismo. El segundo peptido de la proteína de fusión puede comprender un polipéptido derivado de una inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido de inmunoglobulina puede comprender una cadena pesada de inmunoglobulina o

25 una porción (es decir, fragmento) de la misma. Por ejemplo, el fragmento de cadena pesada puede comprender un polipéptido derivado del fragmento Fc de una inmunoglobulina, en donde el fragmento Fc comprende el polipéptido de bisagra de cadena pesada, y los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de inmunoglobulina como un monómero. La cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar de cualquiera de los isotipos de cadena pesada: IgG

30 (γ), IgM(γ), IgM(μ), IgD(δ), IgE (ϵ), o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar a partir de cualquiera de los subtipos de cadena pesada conocida: IgG1(γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. El segundo polipéptido puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana o porciones de cualquiera, o

184
183

ambos, de estos dominios. Como una realización de ejemplo, El polipéptido comprendiendo los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana o una porción del mismo puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

5 La porción FC de la cadena de inmunoglobulina puede ser proinflamatoria *in vivo*. Por lo tanto, en una realización, la proteína de fusión RAGE del presente invento comprende un enlazador de interdominio derivado de RAGE en cambio de un polipéptido de bisagra de interdominio derivado a partir de una inmunoglobulina.

10 Por lo tanto en una realización, la proteína de fusión puede además comprender un polipéptido RAGE directamente unido a un polipéptido que comprende un dominio CH2 de una inmunoglobulina, o un fragmento o porción del dominio CH2 de una inmunoglobulina. En una realización, el dominio CH2, o un fragmento del mismo comprende SEQ ID NO: 42. En una realización, el polipéptido RAGE puede comprender un sitio de unión de ligando. El sitio de unión de ligando RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión de ligando RAGE comprende SEQ ID NO: 9 o
15 una secuencia 90% idéntica a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia 90% idéntica a la misma.

El polipéptido RAGE utilizado en las proteínas de fusión del presente invento puede comprender un dominio de inmunoglobulina RAGE. Adicionalmente o alternativamente, el fragmento de RAGE puede comprender un enlazador de interdominio. O, el polipéptido
20 RAGE puede comprender un dominio de inmunoglobulina RAGE unido a un enlazador de interdominio corriente arriba (es decir, el más cercano al término N) o corriente abajo (es decir, el más cercano al término C). En aún otra realización, el polipéptido RAGE puede comprender dos (o más) dominios de inmunoglobulina RAGE unidos entre sí por un enlazador de interdominios. El polipéptido RAGE puede además comprender múltiples
25 dominios RAGE de inmunoglobulina unidos entre sí por uno o más enlazadores de interdominio y con un enlazador de interdominio terminal unido al dominio de inmunoglobulina RAGE N-terminal y/o el dominio de inmunoglobulina C-terminal. Combinaciones adicionales de dominios de inmunoglobulina RAGE y enlazadores de interdominio están dentro del alcance del presente invento.

30 En una realización, el polipéptido RAGE comprende un enlazador de interdominio RAGE ligado a un dominio de inmunoglobulina RAGE tal que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina RAGE está unido al aminoácido N-terminal del enlazador de interdominio, y el aminoácido C-terminal del enlazador de interdominio RAGE es directamente unido al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio

185
184

CH2 de una inmunoglobulina, o un fragmento del mismo. El polipéptido que comprende un dominio CH2 de una inmunoglobulina puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana o una porción de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como una realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios CH2 y CH3, o una porción de los mismos, de una IgG1 humana pueden comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

Como se describió anteriormente, la proteína de fusión del presente invento puede comprender dominios múltiples o simples de RAGE. También, el polipéptido RAGE que comprende un enlazador de interdominio ligado a un dominio polipéptido RAGE puede comprender un fragmento de proteína de RAGE de longitud total. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender aminoácidos 23-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 15) o una secuencia 90% idéntica a la misma o aminoácidos 24-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 16) o una secuencia 90% idéntica a la misma que corresponde al dominio V de RAGE y un enlazador de interdominio corriente abajo. O, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-251 de RAGE humana (SEQ ID NO: 19) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o aminoácidos 24-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 20) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde al dominio V, el dominio C1, el enlazador de interdominio uniendo estos dos dominios, y un segundo enlazador de interdominio corriente debajo de C1.

Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede comprender dos dominios de inmunoglobulina derivados de proteína RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido Fc humano. La proteína de fusión puede comprender un primer dominio de inmunoglobulina RAGE y un primer enlazador de interdominio RAGE unido a un segundo dominio de inmunoglobulina RAGE y un segundo enlazador de interdominio RAGE, tal que el aminoácido N-terminal del primer enlazador de interdominio está unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de inmunoglobulina RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio RAGE está unido al aminoácido C-terminal del primer enlazador de interdominio, el aminoácido N-terminal del segundo enlazador de interdominio está unido al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina RAGE, y el aminoácido C-terminal del segundo enlazador de interdominio RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal del dominio de inmunoglobulina CH2. En una realización, una cuarta proteína de fusión RAGE puede comprender SEQ ID NO: 32. En realizaciones alternas, una proteína de fusión RAGE de cuatro dominios comprende SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34.

Alternativamente, una proteína de fusión de tres dominios puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido Fc humano. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un dominio de inmunoglobulina RAGE simple unido a través de un enlazador de interdominio RAGE al aminoácido N-terminal de un dominio de inmunoglobulina CH2 o una porción de un dominio de inmunoglobulina CH2. En una realización, una proteína de fusión RAGE de tres dominios puede comprender SEQ ID NO:35. En realizaciones alternas, una proteína de fusión RAGE de tres dominios puede comprender SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37.

Un fragmento de enlazador de interdominio RAGE puede comprender una secuencia peptídica que está naturalmente corriente debajo de, y por lo tanto, unida a, un dominio de inmunoglobulina RAGE. Por ejemplo, para el dominio RAGE V, el enlazador de interdominio puede comprender secuencias aminoácidos que están naturalmente corriente abajo del dominio V. En una realización, el enlazador puede comprender la SEQ ID NO: 21, correspondiente a los aminoácidos 117-123 de RAGE de longitud completa. O, el enlazador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia RAGE natural. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador de interdominio comprendiendo varios aminoácidos (ej., 1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos) corriente arriba y corriente abajo de SEQ ID NO: 21. Por lo tanto, en una realización, el enlazador de interdominio comprende SEQ ID NO: 23 comprendiendo los aminoácidos 117-136 de RAGE de longitud completa. O se pueden utilizar fragmentos de SEQ ID NO: 21 suprimiendo, por ejemplo, 1, 2, o 3 aminoácidos desde cualquier extremo del enlazador. En realizaciones alternas, el enlazador puede comprender una secuencia que es 70% idéntica, o 80% idéntica, o 90% idéntica a SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 23.

Para el dominio RAGE C1, el enlazador puede comprender la secuencia peptídica que está naturalmente corriente abajo del dominio C1. En una realización, el enlazador puede comprender SEQ ID NO: 22, que corresponde a aminoácidos 222-251 de RAGE de longitud completa. O, el enlazador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia RAGE natural. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador que comprende varios aminoácidos (1-3, 1-5, 1-10 o 1-15 aminoácidos) corriente arriba y corriente debajo de SEQ ID NO: 22. O, se pueden utilizar fragmentos de SEQ ID NO: 22, suprimiendo por ejemplo, 1-3, 1-5, o 1-10, 1-15 aminoácidos de cualquier extremo del enlazador. Por ejemplo, en una realización, un enlazador de interdominio RAGE puede comprender SEQ ID NO:24,

correspondiendo a los aminoácidos 222-226. O un enlazador de interdominio puede comprender SEQ ID NO: 44, correspondiendo a aminoácidos RAGE 318-342.

117
188

Métodos para Producir Proteínas de Fusión RAGE

5 El presente invento también comprende un método para preparar una proteína de fusión RAGE. Así, en una realización, el presente invento comprende un método para preparar una proteína de fusión RAGE que comprende el paso de unir covalentemente un polipéptido RAGE a un segundo péptido no RAGE en donde el polipéptido RAGE comprende un sitio de unión de ligandos RAGE. Por ejemplo, el polipéptido RAGE unido y el
10 segundo polipéptido no RAGE se pueden codificar mediante un constructo de ADN recombinante. El método puede además comprender el paso de incorporar el constructo de ADN en un vector de expresión. También, el método puede comprender el paso de insertar el vector de expresión en una célula huésped.

Por ejemplo, las realizaciones del presente invento proporcionan proteínas de fusión
15 comprendiendo un polipéptido RAGE enlazado a un segundo polipéptido no RAGE. En una realización, la proteína de fusión puede comprender un sitio de unión de ligandos RAGE. En una realización, el sitio de unión de ligandos comprende el dominio más N-terminal de la proteína de fusión. El sitio de unión de ligandos RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión de ligandos RAGE
20 comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia 90% idéntica a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia 90% idéntica a la misma.

En una realización, el polipéptido RAGE puede ser unido a un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción (ej., un fragmento del mismo) de un dominio de inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido comprendiendo un
25 dominio de inmunoglobulina comprende al menos una porción de al menos uno de los dominios CH2 o CH3 de un IgG humano.

La proteína de fusión se puede diseñar mediante técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, en una realización, el presente invento pueden comprender una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido RAGE unido a un segundo polipéptido no
30 RAGE. En una realización, el polipéptido RAGE puede comprender un sitio de unión de ligandos RAGE.

La proteína RAGE o polipéptido puede comprender RAGE humano de longitud completa (ej., SEQ ID NO: 1), o un fragmento de RAGE humano. En una realización, el polipéptido RAGE no incluye ningún residuo de secuencia de señal. La secuencia de señal de

RAGE puede comprender cualquiera residuos 1-22 o residuos 1-23 de RAGE de longitud completa (SEQ ID NO:1). En realizaciones alternas, el polipéptido RAGE puede comprender una secuencia 70%, u 80%, o 90% idéntica a RAGE humano, o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido RAGE puede comprender RAGE humano, o un fragmento del mismo, con Glicina como el primer residuo en cambio de Metionina (ver ej., Beeper (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGE de longitud completa con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3) (FIGS 1A y 1B) o una porción de esa secuencia aminoácida. Las proteínas de fusión del presente invento también pueden comprender sRAGE (ej., SEQ ID NO: 4), un polipéptido 90% idéntico a sRAGE, o un fragmento de sRAGE. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender sRAGE humano, o un fragmento del mismo, con Glicina como el primer residuo en cambio de Metionina (ver ej., Beeper (1992)). O, el RAGE humano puede comprender sRAGE con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) (FIG. 1C) o una porción de esa secuencia aminoácida. En otras realizaciones, la proteína RAGE puede comprender un dominio V (ej., SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; FIG. 1D). O, se puede utilizar una secuencia 90% idéntica al dominio V o un fragmento de la misma. O, la proteína RAGE puede comprender un fragmento de RAGE comprendiendo una porción del dominio V (ej., SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, FIG. 1D). En una realización, el sitio de unión de ligandos puede comprender SEQ ID NO: 9, o una secuencia 90% idéntica a la misma, o SEQ ID NO: 10, o una secuencia 90% idéntica a la misma. En aún otra realización, el fragmento RAGE es un péptido sintético.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende SEQ ID NO:25 para codificar aminoácidos 1-118 de RAGE humano o un fragmento del mismo. Por ejemplo, una secuencia que comprende nucleótidos 1-348 de SEQ ID NO: 25 se puede utilizar para codificar aminoácidos 1-116 de RAGE humano. O, el ácido nucleico puede comprender SEQ ID NO:26 para codificar aminoácidos 1-123 de RAGE humano. O, el ácido nucleico puede comprender SEQ ID NO: 27 para codificar aminoácidos 1-136 de RAGE humano. O, el ácido nucleico puede comprender SEQ ID NO: 28 para codificar aminoácidos 1-230 de RAGE humano. O, el ácido nucleico puede comprender SEA ID NO: 20 para codificar aminoácidos 1-251 de RAGE humano. O se puede utilizar fragmentos de estas secuencias de ácido nucleico para codificar fragmentos de polipéptidos RAGE.

La proteína de fusión puede incluir varios tipos de péptidos que no son derivados de RAGE o un fragmento del mismo. El segundo polipéptido de la proteína de fusión puede comprender un polipéptido derivado de una inmunoglobulina. La cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar a partir de cualquier de los isotipos de cadena pesada conocidos:

189
188

IgG (γ), IgM(γ), IgM(μ), IgD(δ), IgE (ϵ), o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar a partir de cualquiera de los subtipos de cadena pesada conocidos: IgG1(γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. El segundo polipéptido puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana o porciones de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como una realización de ejemplo, El polipéptido comprendiendo los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana o una porción del mismo puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40. El péptido de inmunoglobulina se puede codificar mediante la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.

La porción FC de la cadena de inmunoglobulina puede ser proinflamatoria *in vivo*. Por lo tanto, en una realización, la proteína de fusión RAGE del presente invento comprende un enlazador de interdominio derivado de RAGE en cambio de un polipéptido de bisagra de interdominio derivado a partir de una inmunoglobulina. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión se puede codificar mediante un constructo de ADN recombinante.

También, el método puede comprender el paso de incorporar el constructo de ADN en un vector de expresión. También, el método puede comprender transfectar el vector de expresión en una célula huésped.

Por lo tanto, en una realización, el presente invento comprende un método para preparar una proteína de fusión RAGE comprendiendo el paso de unir covalentemente un polipéptido RAGE a un polipéptido comprendiendo un dominio CH2 de una inmunoglobulina o una porción de un dominio CH2 de una inmunoglobulina. En una realización, la proteína de fusión puede comprender un sitio de unión de ligandos RAGE. El sitio de unión de ligandos RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión de ligandos RAGE comprende SEQ ID NO:9 o una secuencia 90% idéntica a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia 90% idéntica a la misma.

Por ejemplo, en una realización, el presente invento comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido RAGE directamente unido a un polipéptido comprendiendo un dominio CH2 de una inmunoglobulina, o un fragmento de la misma. En una realización, el dominio CH2, o un fragmento del mismo, comprende SEQ ID NO:42. El segundo polipéptido puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana. Como una realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40. El péptido de inmunoglobulina se puede codificar mediante la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.

199-
189

En una realización, el polipéptido RAGE puede comprender un enlazador de interdominio RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE tal que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina RAGE está unido al aminoácido N-terminal del enlazador de interdominio, y el aminoácido C-terminal del enlazador de interdominio RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal de un polipéptido comprendiendo un dominio CH2 de una inmunoglobulina, o un fragmento de la misma. El polipéptido comprendiendo un dominio CH2 de una inmunoglobulina puede comprender un polipéptido que comprende los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana o una porción de ambos, o cualquiera de estos dominios. Como una realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana, o una porción de la misma, puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

La proteína de fusión del presente invento puede comprender dominios simples o múltiples a partir de RAGE. También, el polipéptido RAGE que comprende un enlazador de interdominio unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE puede comprender un fragmento de una proteína RAGE de longitud completa. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede comprender dos dominios de inmunoglobulina derivados de la proteína RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido Fc humano. La proteína de fusión puede comprender un primer dominio de inmunoglobulina y un primer enlazador de interdominio unido a un segundo dominio de inmunoglobulina RAGE y un segundo enlazador de interdominio RAGE, tal que el aminoácido N-terminal del primer enlazador de interdominio está unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de inmunoglobulina RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina RAGE está unido al aminoácido C-terminal del primer enlazador de interdominio, el aminoácido N-terminal del segundo enlazador de interdominio está unido al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina RAGE, y el aminoácido C-terminal del segundo enlazador de interdominio RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal del polipéptido comprendiendo un dominio de inmunoglobulina CH2 o fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender aminoácidos 23-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 19) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o aminoácidos 24-251 de RAGE humano (SEQ ID NO:20) o una secuencia 90% idéntica a la misma, correspondiendo al dominio V, el dominio C1, el enlazador de interdominio uniendo estos dos dominios, y un segundo enlazador de interdominio corriente debajo de C1. En una realización, un constructo de ácido nucleico comprendiendo SEQ ID NO: 30 o un fragmento del mismo puede codificar una proteína de fusión RAGE de cuatro dominios.

191
190

Alternativamente, una proteína de fusión de tres dominios puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados a partir de un polipéptido Fc humano. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un dominio de inmunoglobulina RAGE simple unida a través de un enlazador de interdominio RAGE al aminoácido N-terminal del polipéptido comprendiendo un dominio de inmunoglobulina CH2 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender aminoácidos 23-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 15) o una secuencia 90% idéntica a la misma o aminoácidos 24-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 16) o una secuencia 90% idéntica a la misma correspondiendo al dominio V de RAGE y un enlazador de interdominio corriente abajo. En una realización, un constructo aminoácido comprendiendo SEQ ID NO: 31 o un fragmento del mismo puede codificar una proteína de fusión RAGE de tres dominios.

Un fragmento enlazador de interdominio RAGE puede comprender una secuencia péptida que está naturalmente corriente debajo de, y por lo tanto, unida a, un dominio de inmunoglobulina RAGE. Por ejemplo, para el dominio RAGE V, el enlazador de interdominio puede comprender secuencias aminoácidos que están naturalmente corriente abajo desde el dominio V. En una realización, el enlazador puede comprender SEQ ID NO: 21, correspondiendo a aminoácidos 117-123 de RAGE de longitud completa. O, el enlazador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia RAGE natural. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador de interdominio comprendiendo varios aminoácidos (ej., 1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos) corriente arriba y corriente debajo de SEQ ID NO: 21. Por lo tanto, en una realización, el enlazador de interdominio comprende SEQ ID NO: 23 comprendiendo los aminoácidos 117-136 de RAGE de longitud total. O, se pueden utilizar fragmentos de SEQ ID NO: 21 suprimiendo, por ejemplo, 1, 2, o 3, aminoácidos de cualquier extremo del enlazador. En realizaciones alternas, el enlazador puede comprender una secuencia que es 70% idéntica, o 80% idéntica, o 90% idéntica a SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 23.

Para el dominio RAGE C1, el enlazador puede comprender la secuencia peptídica que está naturalmente corriente abajo del dominio C1. En una realización, el enlazador puede comprender SEQ ID NO: 22, correspondiendo a aminoácidos 222-251 de RAGE de longitud completa. O, el enlazador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia RAGE natural. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador que comprende varios aminoácidos (1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos corriente arriba y corriente debajo de SEQ ID NO: 22. O se puede utilizar fragmentos de SEQ ID NO: 22 suprimiendo por ejemplo, 1-3,

192
197

1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos desde cualquier extremo del enlazador. Por ejemplo, en una realización, un enlazador de interdominio puede comprender SEQ ID NO: 24, correspondiendo a aminoácidos 222-226. O un enlazador de interdominio puede comprender SEQ ID NO: 44, correspondiendo a aminoácidos RAGE 318-342.

- 5 El método puede además comprender el paso de incorporar el constructo de ADN en un vector de expresión. Por lo tanto, en una realización, el presente invento comprende un vector de expresión que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido RAGE directamente unido a un péptido comprendiendo un dominio CH2 de una inmunoglobulina o una porción de un dominio CH2 de una inmunoglobulina. En una realización, el péptido
- 10 RAGE comprende constructor, tales como aquellos descritos en la presente, que tienen un enlazador de interdominio RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE tal que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina RAGE está unido al aminoácido N-terminal del enlazador de interdominio, y el aminoácido C-terminal del enlazador de interdominio RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal de un polipéptido
- 15 comprendiendo un dominio CH2 de una inmunoglobulina, o una porción de la misma. Por ejemplo, el vector de expresión utilizado para transfectar las células puede comprender la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 30, o un fragmento de la misma, o SEQ ID NO: 31, o un fragmento de la misma.

- El método puede además comprender el paso de transfectar una célula con el vector de
- 20 expresión del presente invento. Por lo tanto, en una realización, el presente invento comprende una célula transfectada con el vector de expresión que expresó la proteína de fusión RAGE del presente invento, tal que la célula expresa una proteína de fusión comprendiendo un polipéptido RAGE directamente unido a un polipéptido comprendiendo un dominio CH2 de una inmunoglobulina o una porción de un dominio CH2 de una
- 25 inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido RAGE comprende constructor, tales como aquellos descritos en la presente, teniendo un enlazador de interdominio RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE tal que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina RAGE está unido al aminoácido N-terminal del enlazador de interdominio, y el aminoácido C-terminal del enlazador de interdominio RAGE está directamente unido al
- 30 aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio CH2 de una inmunoglobulina, o una porción del mismo. Por ejemplo, el vector de expresión puede comprender la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 30, o un fragmento de la misma.

Por ejemplo, los plásmidos se pueden construir para expresar proteínas de fusión RAGE-IgG Fc al fusionar diferentes longitudes de una secuencia 5' cADN de RAGE humano

193
142

con una secuencia 3' cADN de IgG1 Fc humano ($\gamma 1$). Las secuencias de casete de expresión se pueden insertar en un vector de expresión tal como el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen, CA) utilizando técnicas recombinantes estándares.

5 También, el método puede comprender transfectar el vector de expresión hacia una célula huésped. En una realización, el recombinante puede ser transfectado a células de Ovario de Hamster Chino y la expresión es optimizada. En realizaciones alternas, las células pueden producir 0.1 a 20 gramos/litro, o 0.5 a 10 gramos/litro, o aproximadamente 1-1 gramos/litro.

10 Como se conoce en el estado de la técnica, tales constructos de ácido nucleico se pueden modificar mediante mutación, como por ejemplo, mediante amplificación PCR de un patrón de ácido nucleico con cebadores comprendiendo la mutación de interés. En esta forma, se pueden diseñar polipéptidos que comprenden afinidad variable para ligandos RAGE. En una realización, las secuencias mutadas pueden ser 90% o más idénticas al ADN de inicio. Como tal, los variantes pueden incluir secuencias nucleótidas que hibridizan bajo condiciones
15 severas (es decir, equivalente a 20-27°C por debajo de la temperatura de fusión T_M del ADN dúplex en sal 1 molar).

La secuencia codificadora se puede expresar al transfectar el vector de expresión a un huésped apropiado. Por ejemplo, los vectores recombinantes se pueden transfectar de manera estable a células de Ovario de Hamster Chino (CHO), y células expresando la proteína de
20 fusión seleccionada y clonada. En una realización, las células que expresan el constructo recombinante son seleccionadas para resistencia a neomicina codificada por plásmido mediante la aplicación del antibiótico G418. Los clones individuales se pueden seleccionar y los clones que expresan altos niveles de proteína recombinante detectados por análisis Western Blot del sobrenadante celular se pueden expandir, y el producto genético purificado
25 mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de Proteína A.

Las realizaciones de muestra de ácidos nucleicos recombinantes que codifican las proteínas de fusión del presente invento son mostradas en las Figs 2-5. Por ejemplo, como se describió anteriormente, la proteína de fusión producida por el constructo de ADN recombinante pueden comprender un polipéptido RAGE unido a un segundo polipéptido no
30 RAGE. La proteína de fusión puede comprender dos dominios derivados de la proteína RAGE y dos dominios derivados de una inmunoglobulina. Un constructo de ácido nucleico de ejemplo que codifica una proteína de fusión, TTP-4000 (TT4), que tiene este tipo de estructura es mostrado como FIG. 2 (SEQ ID NO: 30). Como se muestra en la fig. 2, la

194
793

secuencia codificadora 1-753 (resaltada en negrilla) codifica la secuencia de proteína RAGE N-terminal mientras la secuencia de 754-1386 codifica la secuencia de proteína IgG Fc.

5 Cuando se deriva a partir de SEQ ID NO: 30, o una secuencia 90% idéntica a la misma, la proteína de fusión puede comprender la secuencia aminoácida de cuatro dominios de SEQ ID NO: 32, o el polipéptido con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34= (FIG. 4). En la Fig. 4, la secuencia aminoácida RAGE es resaltada en fuente negrilla. La secuencia de inmunoglobulina es los dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3 de IgG. Como se muestra en la Fig. 6B, los primeros 251 aminoácidos de la proteína de fusión TTP-4000 de longitud completa contiene como la secuencia polipéptida RAGE una secuencia
10 de señal que comprende los aminoácidos 1-22/23, el dominio de inmunoglobina V (incluyendo el sitio de unión de ligados) comprendiendo aminoácidos 23/24-116, un enlazador de interdominio que comprende los aminoácidos 117 a 123, un segundo dominio de inmunoglobulina (C1) comprendiendo los aminoácidos 124-221, y un enlazador de interdominio corriente abajo comprendiendo los aminoácidos 222-251.

15 En una realización, la proteína de fusión puede no necesariamente comprender el segundo dominio de inmunoglobulina RAGE. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido Fc humano. Un constructo de ácido nucleico que codifica este tipo de proteína de fusión es mostrado como Fig. 3 (SEQ ID NO: 31). Como
20 se muestra en la Fig. 3, la secuencia codificadora a partir de los nucleótidos 1 a 408 (resaltada en negrilla) codifica la secuencia de proteína N-terminal RAGE, mientras la secuencia de 409 a 1041 codifica la secuencia de proteína IgG1 Fc (γ 1).

Cuando se deriva de SEQ ID NO: 31, o una secuencia 90% idéntica a la misma, la proteína de fusión puede comprender la secuencia aminoácida de tres dominios de SEQ ID
25 NO: 35, o el polipéptido con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37) (Fig. 5). En la Fig. 5, la secuencia aminoácida RAGE es resaltada con fuente negrilla. Como se muestra en la Fig. 6B, los primeros 136 aminoácidos de la proteína de fusión TTP-3000 RAGE de longitud completa contiene como el polipéptido RAGE una secuencia de señal que comprende los aminoácidos 1-22/23, el dominio de inmunoglobulina
30 V (incluyendo el sitio de unión de ligandos) comprendiendo los aminoácidos 23/24-116, y un enlazador de interdominio que comprende los aminoácidos 117 a 136. La secuencia de 137 a 346 incluye los dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3 de IgG.

Las proteínas de fusión del presente invento pueden comprender estabilidad *in vivo* mejorada sobre polipéptidos RAGE que no comprenden un segundo polipéptido. La proteína

145
194

de fusión además puede ser modificada para aumentar estabilidad, eficacia, potencia y biodisponibilidad. Por lo tanto, las proteínas de fusión del presente invento pueden ser modificadas mediante procesamiento post-translacional o mediante modificación química. Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser preparada de manera sintética para incluir aminoácidos L-, D-, o no naturales, aminoácidos alfa-disustituidos, o aminoácidos N-alquilo. Adicionalmente, las proteínas se pueden modificar mediante acetilación, acilación, ribosilación-ADP, amidación, fijación de lípidos fosfatidiinositol, formación de enlaces de disulfuro, y similares. Además, se puede agregar glicol de polietileno para aumentar la estabilidad biológica de la proteína de fusión.

Unión de Antagonistas RAGE a proteínas de fusión RAGE

Las proteínas de fusión del presente invento pueden comprender un número de aplicaciones. Por ejemplo, la proteína de fusión del presente invento se puede utilizar en un ensayo de unión para identificar ligandos RAGE, tales como agonistas RAGE, antagonistas, o moduladores.

Por ejemplo, en una realización, el presente invento proporciona un método para detección de moduladores RAGE comprendiendo: (a) proporcionar una proteína de fusión que comprende un polipéptido RAGE unido a un segundo polipéptido no RAGE, donde el polipéptido RAGE comprende un sitio de unión de ligandos; (b) mezclar un compuesto de interés y un ligando que tiene una afinidad de unión conocida para RAGE con la proteína de fusión; y (c) medir la unión del ligando RAGE conocido a la proteína de fusión RAGE en la presencia del compuesto de interés. En una realización, el sitio de unión de ligandos comprende el dominio más terminal de la proteína de fusión.

Las proteínas de fusión RAGE también pueden proporcionar kits para la detección de moduladores RAGE. Por ejemplo, en una realización, un kit del presente invento puede comprender (a) un compuesto que tiene afinidad de unión conocida a RAGE como un control positivo; (b) una proteína de fusión RAGE que comprende un polipéptido RAGE unido a un segundo polipéptido no RAGE, en donde el polipéptido RAGE comprende un sitio de unión de ligandos RAGE; y (c) instrucciones para utilizar. En una realización, el sitio de unión de ligandos comprende el dominio N-terminal de la proteína de fusión.

La proteína RAGE o polipéptido puede comprender RAGE humano de longitud completa (ej., SEQ ID NO: 1), o un fragmento de RAGE humano. En una realización, el polipéptido RAGE no incluye ningún residuo de secuencia de señal. La secuencia de señal de RAGE puede comprender residuos 1-22 o residuos 1-23 de RAGE de longitud completa

196
195

(SEQ ID NO: 1). En realizaciones alternas, el polipéptido RAGE puede comprender una secuencia 70%, 80%, o 90% idéntica a RAGE humano, o un fragmento de la misma. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido RAGE puede comprender RAGE humano, o un fragmento del mismo, con Glicina como el primer residuo en cambio de Metionina (Ver, 5 Beeper, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGE de longitud completa con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3) (FIGS. 1A y 1B) o una porción de esa secuencia aminoácida. Las proteínas de fusión del presente invento también pueden comprnder sRAGE (ej., SEQ ID NO:4), un polipéptido 90% idéntico a sRAGE, o un fragmento de sRAGE. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender sRAGE humano, 10 o un fragmento del mismo, con Glicina como el primer residuo en cambio de Metionina (Ver ej., Beeper, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender sRAGE con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) (Fig. 1C) o una porción de esa secuencia aminoácida. En otras realizaciones, la proteína RAGE puede comprender un dominio V (ej., SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; Fig. 1D). O se puede utilizar una secuencia 90% idéntica al 15 dominio V o un fragmento de la misma. O, la proteína RAGE puede comprender un fragmento de RAGE que comprende una porción del dominio V (ej., SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, FIG. 1D). En una realización, el sitio de unión de ligandos puede comprender SEQ ID NO: 9, o una secuencia 90% idéntica a la misma, o SEQ ID NO: 10, o una secuencia 90% idéntica a la misma. En aún otra realización, el fragmento RAGE es un péptido sintético. 20

La proteína de fusión puede incluir varios tipos de péptidos que no son derivados de RAGE o un fragmento del mismo. El segundo péptido de la proteína de fusión puede comprender un polipéptido derivado de una inmunoglobulina. La cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar a partir de cualquier de los isotipos de cadena pesada conocidos: IgG (γ), IgM(μ), IgD(δ), IgE (ϵ), o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de 25 la misma) se puede derivar a partir de cualquiera de los subtipos de cadena pesada conocida: IgG1(γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. El segundo polipéptido puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana o una porción de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como una realización de ejemplo, el polipéptido comprendiendo 30 los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana o una porción del mismo puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40. El péptido de inmunoglobulina se puede codificar mediante la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.

La porción Fc de la cadena de inmunoglobulina puede ser proinflamatoria *in vivo*. Por lo tanto, la proteína de fusión RAGE del presente invento puede comprender una secuencia Fc

197
196

derivada de RAGE en cambio de una cadena de inmunoglobulina. En una realización, la proteína de fusión puede comprender un dominio de inmunoglobulina RAGE unido a un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina CH2 o un fragmento del mismo. En una realización, el polipéptido RAGE puede comprender un enlazador de interdominio

5 RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE tal que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina RAGE está unido al aminoácido N-terminal del enlazador de interdominio, y el aminoácido C-terminal del enlazador de interdominio RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio

10 CH2 de una inmunoglobulina, o un fragmento del mismo. El polipéptido comprendiendo un dominio CH2 de una inmunoglobulina puede comprender un polipéptido que comprende los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana o una porción de ambos, o cualquiera, de estos dominios. Como una realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios CH2 y CH3 de una IgG1, o una porción de la misma, puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

15 La proteína de fusión del presente invento puede comprender dominios múltiples o simples de RAGE. También, el polipéptido RAGE que comprende un enlazador de interdominio unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE puede comprender un fragmento de una proteína RAGE de longitud completa. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede comprender dos dominios de inmunoglobulina derivados de la proteína RAGE y

20 dos dominios de inmunoglobulina derivados a partir de un polipéptido Fc humano. La proteína de fusión puede comprender un primer dominio de inmunoglobulina RAGE y un primer enlazador de interdominio unido a un segundo dominio de inmunoglobulina RAGE y un segundo enlazador de interdominio RAGE, tal que el aminoácido N-terminal del primer enlazador de interdominio está unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de

25 inmunoglobulina RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina RAGE está ligado al aminoácido C-terminal del primer enlazador de interdominio, el aminoácido N-terminal del segundo enlazador de interdominio está ligado al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina RAGE, y el aminoácido C-terminal del segundo enlazador de interdominio RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal

30 del polipéptido comprendiendo un dominio de inmunoglobulina CH2 o fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender aminoácidos 23-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 19) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o aminoácidos 24-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 20) o una secuencia 90% idéntica a la misma, correspondiente al dominio-V, el dominio C1, el enlazador de interdominio que une estos dos dominios, y un

1978
1027

segundo enlazador de interdominio corriente debajo de C1. En una realización, un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 30 o un fragmento del mismo puede codificar una proteína de fusión RAGE de cuatro dominios.

Alternativamente, una proteína de fusión de tres dominios puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido Fc humano. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un dominio de inmunoglobulina RAGE unido a través de un enlazador de interdominio RAGE al aminoácido N-terminal del polipéptido comprendiendo un dominio de inmunoglobulina CH2 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender aminoácidos 23-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 15) o una secuencia 90% idéntica a la misma o aminoácidos 24-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 16) o una secuencia 90% idéntica a la misma correspondiente al dominio V de RAGE y un enlazador de interdominio corriente abajo. En una realización, un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 31 o un fragmento del mismo puede codificar una proteína de fusión RAGE de tres dominios.

Como se describió en la presente, el fragmento enlazador de interdominio RAGE puede comprender una secuencia peptídica que está naturalmente corriente debajo de, y por lo tanto, está unida a, un dominio de inmunoglobulina RAGE. Por ejemplo, para el dominio RAGE V, el enlazador de interdominio puede comprender secuencias aminoácidas que están naturalmente corriente abajo del dominio V. En una realización, el enlazador puede comprender SEQ ID NO: 21, correspondiente a los aminoácidos 117-123 de RAGE de longitud completa. O, el enlazador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia RAGE natural. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador de interdominio que comprende varios aminoácidos (ej., 1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos) corriente arriba y corriente debajo de SEQ ID NO: 21. Por lo tanto, en una realización, el enlazador de interdominio comprende SEQ ID NO: 23 comprendiendo aminoácidos 117-136 de RAGE de longitud completa. O se puede utilizar fragmentos de SEQ ID NO: 21 suprimiendo, por ejemplo, 1, 2, o 3, aminoácidos desde cualquier extremo del enlazador. En realizaciones alternas, el enlazador puede comprender una secuencia que es 70% idéntica, o 80% idéntica, o 90% idéntica a SEQ ID NO: 21 o SEQ NO: 23.

Para el dominio RAGE C1, el enlazador puede comprender la secuencia péptida que está naturalmente corriente abajo del dominio C1. En una realización, el enlazador puede comprender SEQ ID NO: 22, que corresponde a aminoácidos 222-251 de RAGE de longitud completa. O, el enlazador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la

199
~~198~~

secuencia RAGE natural. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador que comprende varios aminoácidos (1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos) corriente arriba y corriente debajo de SEQ ID NO: 22. O se pueden utilizar fragmentos de SEQ ID NO: 22, suprimiendo por ejemplo, 1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos desde cualquier extremo del enlazador. Por
5 ejemplo, en una realización, un enlazador de interdominio RAGE puede comprender SEQ ID NO: 24, correspondiente a aminoácidos 222-226. O un enlazador de interdominio puede comprender SEQ ID NO: 44, correspondiente a aminoácidos RAGE 318-342.

Por ejemplo, la proteína de fusión RAGE se puede utilizar en un ensayo de unión para identificar ligandos RAGE potenciales. En una realización de ejemplo de tal ensayo de unión,
10 un ligando RAGE conocido puede ser recubierto sobre un sustrato sólido (ej., placas Maxisorb) a una concentración de aproximadamente 5 microgramos por pozo, donde cada pozo contiene un volumen total de 100 microlitros aproximadamente (uL). Las placas se pueden incubar a 4°C durante la noche para permitir al ligando absorber. Alternativamente, se pueden utilizar periodos de incubación más cortos a mayor temperatura (ej., temperatura
15 ambiente). Después de un periodo de tiempo para permitir al ligando fijarse al sustrato, los pozos de ensayo se pueden aspirar y se puede agregar un buffer bloqueador (ej., BSA al 1% en 50 mM de buffer de imidazol, pH 7.2) para bloquear unión no específica. Por ejemplo, se puede agregar buffer bloqueador a las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego las placas se pueden aspirar y/ lavar con un buffer de lavado. En una realización, un buffer
20 comprendiendo 20 nM Unuduzik, 150 mM NaCl, Tween-20 al 0.05%, 5 mM CaCl₂ y 5 mM MgCl₂, pH 7.2 se puede utilizar como un buffer de lavado. La proteína de fusión luego puede ser agregada a diluciones crecientes a los pozos de ensayo. La proteína de fusión RAGE luego se puede dejar incubar con el ligando inmovilizado en el pozo de ensayo tal que la unión puede lograr equilibrio. En una realización, la proteína de fusión RAGE es dejada
25 incubar con el ligando inmovilizado durante aproximadamente una hora a 37°C. En realizaciones alternas, se pueden utilizar periodos de incubación más largos a temperaturas menores. Después que la proteína de fusión y ligando inmovilizado ha sido incubados, la placa puede ser lavada para retirar cualquier proteína de fusión sin fijar. La proteína de fusión unida al ligando inmovilizado se puede detectar en una variedad de formas. En una
30 realización, la detección emplea una ELISA. Así, en una realización, un complejo de inmunodetección conteniendo un IgG1 anti-humano de ratón monoclonal, IgG anti-ratón de cabra biotinilado, y una fosfatasa alcalina unida a una avidina se pueden agregar a la proteína de fusión inmovilizada en el pozo de ensayo. El complejo de inmunodetección puede ser dejado fijar a la proteína de fusión inmovilizada tal que la unión entre la proteína de fusión y

200
199

el complejo de inmunodetección logra equilibrio. Por ejemplo, el complejo puede ser dejado fijar a la proteína de fusión durante una hora a temperatura ambiente. En ese punto, cualquier complejo sin fijar puede ser retirado al lavar el pozo de ensayo con buffer de lavado. El complejo fijado se puede detectar agregando sustrato de fosfatasa alcalina, *para*-nitrofenilfosfato (PNPP), y midiendo la conversión de PNPP a *para*-nitrofenol (PNP) como un aumento en absorbancia a 405 nm.

En una realización, el ligando RAGE se fija a la proteína de fusión RAGE con afinidad nanomolar (nM) o micromolar (uM). Un experimento que ilustra unión de ligandos RAGE a proteínas de fusión RAGE del presente invento es mostrado en la Fig. 7. Se prepararon soluciones de TTP-3000 (TT3) y TTP-4000 (TT4) con concentraciones iniciales de 1.082 mg/mL, y 370 ug/mL, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 7, a varias diluciones, las proteínas de fusión TTP-3000 y TTP-4000 se pueden fijar para inmovilizar ligandos RAGE Amyloid-beta (Abeta) (Amyloid Beta (1-40) de Biosource), S100b (S100, y anfoterita (Ampho), produciendo un aumento en absorbancia. En la ausencia de ligando (*es decir*, recubrimiento solamente con BSA) no existió aumento en absorbancia.

El ensayo de unión del presente invento se puede utilizar para cuantificar unión de ligandos a RAGE. En realizaciones alternas, los ligandos RAGE se pueden fijar a la proteína de fusión del presente invento con afinidades de unión en el rango entre 0.1 a 1000 nanomolar (nM), o entre 1 y 500 nM, o entre 10 y 80 nM.

La proteína de fusión del presente invento también se puede utilizar para identificar compuestos que tienen la capacidad de fijarse a RAGE. Como se muestra en las Figs. 8 y 9, respectivamente, un ligando RAGE se puede probar para su capacidad para competir con amiloide inmovilizado beta para fijarse a proteínas de fusión TTP-4000 (TT4) o TTP-3000 (TT3). Así, se puede observar que un ligando RAGE a una concentración de ensayo final (FAC) de 10 uM puede desplazar unión de proteína de fusión RAGE a amiloide-beta a concentraciones de 1:3, 1:10, 1:30, 1:100 de la solución TTP-4000 (Fig. 8) o TTP-300 (Fig. 9).

Modulación de Efectores Celulares

Las realizaciones de las proteínas de fusión del presente invento se pueden utilizar para modular una respuesta biológica mediada por RAGE. Por ejemplo, las proteínas de fusión se pueden diseñar para modular aumentos inducidos por RAGE en expresión genética. Así, en una realización, las proteínas de fusión del presente invento se pueden utilizar para modular la función de enzimas biológicas. Por ejemplo, la interacción entre RAGE y sus

201
200

ligandos puede generar estrés oxidativo y activación de NF-KB, y genes regulados por NF-KB, tal como las citoquinas IL-1 β , TNF- α , y similares. Además, otras diferentes rutas reguladoras, tales como aquellas que involucran p21ras, quinasas MAP, ERK1, y ERK2, se han mostrado como activadas mediante unión de AGEs y otros ligandos a RAGE.

5 El uso de las proteínas de fusión del presente invento para modular expresión del efector celular TNF- α se muestra en la Fig. 10. Células mieloides THP-1 se pueden cultivar en medio RPMI-1640 suplementado con FNS al 10% e inducir para secretar TNF-alfa a través de estimulación de RAGE con S100b. Cuando tal estimulación ocurre en presencia de una proteína de fusión RAGE, la inducción de TNF- α mediante la unión S100b a RAGE se puede
10 inhibir. Por lo tanto, como se muestra en la Fig. 10, la adición de 10 ug de proteína de fusión RAGE TTP-3000 (TT3) o TTP-4000 (TT4) reduce la inducción S100b de TNF- α en aproximadamente 50% a 75%. La proteína de fusión TTP-4000 puede ser al menos tan efectiva para bloquear inducción S100b de TNF- α como sRAGE (Fig. 10). La especificidad de la inhibición para las secuencias RAGE de TTP-4000 y TTP-3000 es mostrada mediante el
15 experimento en el cual IgG sola es agregada a células S100b-estimuladas. La adición de IgG y S100b al ensayo muestra los mismos niveles de TNF- α que S100n solo.

Características Fisiológicas de Proteínas de Fusión RAGE

Mientras sRAGE puede tener un beneficio terapéutico en la modulación de
20 enfermedades mediadas por RAGE, sRAGE humano puede tener limitaciones como solo un terapéutico basado en la vida media relativamente corta de sRAGE en plasma. Por ejemplo, mientras sRAGE de roedor tiene una vida media en ratas normales y diabéticas de aproximadamente 20 horas, sRAGE humano tiene una vida media de menos de 2 horas cuando se evaluó en retención de inmunoreactividad sRAGE (Renard, *J. Pharmacol. Exp.*
25 *Ther.*, 290: 1458-1466 (1999)).

Para generar un terapéutico RAGE que tenga características de unión similares a sRAGE, pero un perfil farmacocinética más estable, se puede utilizar una proteína de fusión RAGE que comprende un sitio de unión de ligandos RAGE unido a uno o más dominios de inmunoglobulina humana. Como es bien conocido en el estado de la técnica, los dominios de
30 inmunoglobulina pueden incluir la porción Fc de la cadena pesada de inmunoglobulina.

La porción Fc de inmunoglobulina puede conferir varios atributos a una proteína de fusión. Por ejemplo, la proteína de fusión Fc puede aumentar la vida media en suero de tales proteínas de fusión, a menudo de horas a varios días. El aumento en estabilidad

202
201

farmacocinética generalmente es el resultado de la interacción del enlazador entre las regiones CH2 y CH3 del fragmento Fc con el receptor FcRn (Wines, *J. Immunol.* 164:5313-5318 (2000)).

Aunque las proteínas de fusión que comprenden un polipéptido Fc de
5 inmunoglobulina pueden proporcionar la ventaja de estabilidad aumentada, las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden producir una respuesta inflamatoria cuando se introducen en un huésped. La respuesta inflamatoria se puede deber en gran parte, a la porción Fc de la inmunoglobulina de la proteína de fusión. La respuesta inflamatoria puede ser una característica deseable si el objetivo es expresado sobre un tipo de célula enfermo que
10 necesita ser eliminado (ej., una célula cancerosa, uno o una población de linfocitos que producen una enfermedad autoinmune). La respuesta proinflamatoria puede ser una característica neutral si el objetivo es una proteína soluble, como la mayoría de proteínas solubles no activa inmunoglobulinas. Sin embargo, la respuesta inflamatoria puede ser una característica negativa si el objetivo es expresado sobre tipos celulares cuya destrucción
15 llevaría a efectos secundarios adversos. También, la respuesta proinflamatoria puede ser una característica negativa si una cascada inflamatoria es establecida en el sitio de una unión de proteína de fusión a un objetivo de tejido, puesto que muchos mediadores de inflamación pueden ser perjudiciales para el tejido circundante, y/o pueden producir efectos sistemáticos.

El sitio proinflamatorio primario sobre fragmentos Fc de inmunoglobulina reside en la
20 región de bisagra entre CH1 y CH2. Esta región de bisagra interactúa con el FcR1-3 sobre varios leucocitos y activa estas células para atacar el objetivo. (Wines, *J. Immunol.*, 164:5313-5318 (2000)).

Como terapéuticos para enfermedades mediadas por RAGE, las proteínas de fusión RAGE pueden no requerir la generación de una respuesta inflamatoria. Así, las realizaciones
25 de las proteínas de fusión RAGE del presente invento pueden comprender una proteína de fusión que comprende un polipéptido RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina donde la región de bisagra Fc desde la inmunoglobulina es retirada y recolocada con un polipéptido RAGE. En esta forma, se puede minimizar la interacción entre la proteína de fusión RAGE y los receptores Fc sobre células inflamatorias. Sin embargo, puede ser importante mantener
30 apilamiento adecuado y otras interacciones estructurales tridimensionales entre los varios dominios de inmunoglobulina de la proteína de fusión. Así, las realizaciones de las proteínas de fusión del presente invento pueden sustituir el enlazador de interdominio RAGE biológicamente inerte, pero estructuralmente similar que separa los dominios V y C1 de RAGE, o el enlazador que separa los dominios C1 y C2 de RAGE, en vez de la región de

203
202

bisagra normal de la cadena pesada de inmunoglobulina. Así, el polipéptido RAGE de la proteína de fusión puede comprender una secuencia enlazadora de interdominio que es naturalmente encontrada corriente debajo de un dominio de inmunoglobulina RAGE para formar una dominio de inmunoglobulina RAGE/fragmento enlazador. En esta forma las interacciones tridimensionales entre los dominios de inmunoglobulina aportadas por RAGE o la inmunoglobulina pueden ser mantenidas.

En una realización, una proteína de fusión RAGE del presente invento puede comprender un aumento sustancial en estabilidad farmacocinética en comparación con sRAGE. Por ejemplo, la Fig. 11 muestra que una vez la proteína de fusión RAGE TTP-4000 ha saturado sus ligandos, puede retener una vida media de mas de 300 horas. Esto puede ser contrastado con la vida media para sRAGE de solo una pocas horas en plasma humano.

Así, en una realización, las proteínas de fusión RAGE del presente invento se pueden utilizar para antagonizar la unión de ligandos fisiológicos a RAGE como un medio para tratar enfermedades mediadas por RAGE sin generar una cantidad inaceptable de inflamación. Las proteínas de fusión del presente invento pueden exhibir una disminución sustancial para generar una respuesta proinflamatoria en comparación con IgG. Por ejemplo, como se muestra en la Fig. 12, la proteína de fusión RAGE TTP-4000 no estimula la liberación TNF- α a partir de células bajo condiciones donde la estimulación IgG humano de liberación TNF- α es detectada.

Tratamiento de Enfermedad con Proteínas de Fusión RAGE

El presente invento también puede comprender métodos para el tratamiento de trastornos mediados por RAGE en un sujeto humano. En una realización, el método puede comprender administrar a un sujeto una proteína de fusión comprendiendo un polipéptido RAGE que comprende un sitio de unión de ligandos RAGE unido a un segundo polipéptido no RAGE. En una realización, la proteína de fusión puede comprender un sitio de unión de ligandos. En una realización, el sitio de unión de ligandos comprende el dominio más N-terminal de la proteína de fusión. El sitio de unión de ligando RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión de ligandos RAGE comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia 90% idéntica a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia 90% idéntica a la misma.

En una realización, el polipéptido RAGE puede estar unido a un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción (ej., un fragmento del mismo) de un dominio de inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido que comprende un

20A
203

dominio de inmunoglobulina comprende al menos una porción de al menos uno de los dominios CH2 o CH3 de IgG humano.

La proteína RAGE o polipéptido puede comprender RAGE humano de longitud completa (ej., SEQ ID NO: 1), o un fragmento de RAGE humano. En una realización, el polipéptido RAGE no incluye ningún residuo de secuencia de señal. La secuencia de señal de RAGE puede comprender cualquiera residuos 1-22 o residuos 1-23 de RAGE de longitud completa (SEQ ID NO: 1). En realizaciones alternas, el polipéptido RAGE puede comprender una secuencia que es 70%, 80% o 90% idéntica a RAGE humano o un fragmento de la misma. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido RAGE puede comprender RAGE humano, o un fragmento del mismo, con Glicina como el primer residuo en cambio de Metionina (ver ej., Neeper (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGE de longitud completa con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ NO: 2 o SEQ ID NO: 3) (Figs. 1A y 1B) o una porción de esa secuencia aminoácida. Las proteínas de fusión del presente invento también pueden comprender sRAGE (ej., SEQ ID NO:4), un polipéptido 90% idéntico a sRAGE, o un fragmento de sRAGE. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender sRAGE humano, o un fragmento del mismo, con Glicina como el primer residuo en cambio de una Metionina (ver ej., Neeper (1992)). O el RAGE humano puede comprender sRAGE con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) (Fig. 1C) o una porción de esa secuencia aminoácida. En otras realizaciones, la proteína RAGE puede comprender un dominio V (ej., SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; Fig 1D). O se puede utilizar una secuencia 90% idéntica al dominio V o un fragmento de la misma. O, la proteína RAGE puede comprender un fragmento de RAGE que comprende una porción del dominio V (ej., SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, Fig. 1D). En una realización, el sitio de unión de ligandos puede comprender SEQ ID NO: 9, o una secuencia 90% idéntica a la misma, o SEQ ID NO: 10, o una secuencia 90% idéntica a la misma. En aún otra realización, el fragmento RAGE es un péptido sintético.

La proteína de fusión puede incluir varios tipos de péptidos que no se derivan de RAGE o un fragmento del mismo. El segundo polipéptido de la proteína de fusión puede comprender un polipéptido derivado de una inmunoglobulina. La cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar a partir de cualquiera de los isotipos de cadena pesada conocidos: IgG (γ), IgM(γ), IgM(μ), IgD(δ), IgE (ϵ), o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar a partir de cualquiera de los subtipos de cadena pesada conocidos: IgG1(γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. El segundo polipéptido puede

205
204

comprender los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana o porciones de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como una realización de ejemplo, El polipéptido comprendiendo los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana o una porción del mismo puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40. El péptido de inmunoglobulina se puede codificar mediante la
5 secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO:41.

Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprende aminoácidos 23-116 de RAGE humano (SEQ ID NO:7) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o aminoácidos 24-116 de RAGE humana (SEQ ID NO:8) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde al dominio V de RAGE. O, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 124-221
10 de RAGE humano (SEQ ID NO:1) o una secuencia 90% idéntica a la misma, correspondiente al dominio C1 de RAGE. En otra realización, el polipéptido RAGE puede comprender aminoácidos 227-317 de RAGE humano (SEQ ID NO:12) o una secuencia 90% idéntica a la misma, correspondiente al dominio C2 de RAGE. O, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-123 de RAGE humano (SQ ID NO:13) o una secuencia 90% idéntica a la
15 misma, o aminoácidos 24-123 de RAGE humano (SEQ ID NO: 14) o una secuencia 90% idéntica a la misma, correspondiente al dominio V de RAGE y un enlazador de interdominio corriente abajo. O, el polipéptido RAGE puede comprender aminoácidos 23-226 de RAGE humano (SEQ ID NO: 17) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o aminoácidos 24-226 de RAGE humano (SEQ ID NO: 18) o una secuencia 90% idéntica a la misma,
20 correspondiente al dominio V, el dominio C1 y el enlazador de interdominio unidos estos dos dominios. O, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 5) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o 24-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 6) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde a sRAGE (es decir, que codifica los dominios V, C1, y C2 y enlazadores de interdominio). O se
25 pueden utilizar fragmentos de cada una de estas secuencias.

La porción Fc de la cadena de inmunoglobulina puede ser proinflamatoria *in vivo*. Por lo tanto, en una realización, la proteína de fusión RAGE del presente invento comprende un enlazador de interdominio derivado de RAGE en cambio de un polipéptido de bisagra de interdominio derivado de una inmunoglobulina.

30 Así en una realización, la proteína de fusión puede además comprender un polipéptido RAGE directamente unido a un polipéptido que comprende un dominio CH2 de una inmunoglobulina, o un fragmento de la misma. En una realización, el dominio CH2, o fragmento del mismo comprende SEQ ID NO: 42.

256
205

En una realización, el polipéptido RAGE comprende un enlazador de interdominio RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE tal que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina RAGE está unido al aminoácido N-terminal del enlazador de interdominio, y el aminoácido C-terminal del enlazador de interdominio RAGE está
5 directamente unido al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio CH2 de una inmunoglobulina, o un fragmento del mismo. El polipéptido comprendiendo un dominio CH2 de una inmunoglobulina puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana. Como una realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

10 La proteína de fusión del presente invento puede comprender un dominio simple o múltiple de RAGE. También, el polipéptido RAGE que comprende un enlazador de interdominio unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE puede comprender un fragmento de una proteína RAGE de longitud completa. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede comprender dos dominios de inmunoglobulina derivados de la proteína RAGE y
15 dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido Fc humano. La proteína de fusión puede comprender un primer dominio de inmunoglobulina RAGE y un primer enlazador de interdominio unido a un segundo dominio de inmunoglobulina RAGE y un segundo enlazador de interdominio RAGE, tal que el aminoácido N-terminal del primer enlazador de interdominio esté unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de
20 inmunoglobulina RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina RAGE está unido al aminoácido C-terminal del primer enlazador de interdominio, el aminoácido N-terminal del segundo enlazador de interdominio está unido al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina RAGE, y el aminoácido C-terminal del segundo enlazador de interdominio RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal
25 del polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina CH2 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 19) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o aminoácidos 24-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 20) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde al dominio V, el dominio C1, el enlazador de interdominio que une estos dos
30 dominios, y un segundo enlazador de interdominio corriente abajo de C1. En una realización, un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 30 o una fragmento de la misma puede codificar una proteína de fusión RAGE de cuatro dominios.

Alternativamente, una proteína de fusión de tres dominios puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina

207
206

derivados de un polipéptido Fc humano. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un dominio de inmunoglobulina RAGE simple unido a través de un enlazador de interdominio RAGE al aminoácido N-terminal del polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina CH2 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 15) o una secuencia 90% idéntica a la misma que corresponde al dominio V de RAGE y un enlazador de interdominio corriente abajo. En una realización, un constructo de ácido nucleico comprendiendo SEQ ID NO: 31 o un fragmento del mismo puede codificar una proteína de fusión RAGE de tres dominios.

Un fragmento enlazador de interdominio RAGE puede comprender una secuencia peptídica que está naturalmente corriente debajo de, y por lo tanto, unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE. Por ejemplo, para el dominio RAGE V, el enlazador de interdominio puede comprender secuencias aminoácidas que están naturalmente corriente abajo del dominio V. En una realización, el enlazador puede comprender SEQ ID NO: 21, que corresponde a aminoácidos 117-123 de RAGE de longitud completa. O, el enlazador puede comprender un péptido que tienen porciones adicionales de la secuencia RAGE natural. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador de interdominio que comprende varios aminoácidos (ej., 1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos) corriente arriba y corriente debajo de SEQ ID NO: 21. Por lo tanto, en una realización, el enlazador de interdominio comprende SEQ ID NO: 23 que comprende los aminoácidos 117-136 de RAGE de longitud completa. O se puede utilizar fragmentos de SEQ ID NO: 21 suprimiendo, por ejemplo, 1, 2, o 3 aminoácidos desde cualquier extremo del enlazador. En realizaciones alternas, el enlazador puede comprender una secuencia que es 70% idéntica, o 80% idéntica, o 90% idéntica a SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 23.

Para el dominio RAGE C1, el enlazador puede comprender la secuencia peptídica que naturalmente está corriente abajo del dominio C1. En una realización, el enlazador puede comprender SEQ ID NO: 22, que corresponde a los aminoácidos 222-251 de RAGE de longitud completa. O el enlazador puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia RAGE natural. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador que comprende varios aminoácidos (1-3, 1-5, o 1-10 aminoácidos) corriente arriba y corriente debajo de SEQ ID NO: 22. O se pueden utilizar fragmentos de SEQ ID NO: 22, suprimiendo por ejemplo, 1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos de cualquier extremo del enlazador. Por ejemplo, en una realización, un enlazador de interdominio RAGE puede comprender SEQ ID

208.
207

NO: 24, que corresponde a los aminoácidos 222-226. O un enlazador de interdominio puede comprender SEQ ID NO: 44, que corresponde a aminoácidos RAGE 318-342.

En una realización, una proteína de fusión del presente invento se puede administrar mediante varias rutas. La administración de la proteína de fusión RAGE del presente invento
5 puede emplear inyección intraperitoneal (IP). Alternativamente, la proteína de fusión RAGE se puede administrar de manera oral, intranasal, o como un aerosol. En otra realización, la administración es intravenosa (IV). La proteína de fusión RAGE también se puede inyectar subcutáneamente. En otra realización, la administración de la proteína de fusión es intra-arterial. En otra realización, la administración es sublingual. También, la administración
10 puede emplear una capsula de liberación de tiempo. En aún otra realización, la administración puede ser transrectal, como por medio de un supositorio o similares. Por ejemplo, la administración subcutanea puede ser útil para tratar trastornos crónicos cuando la auto-administración es deseable.

Una variedad de modelos animales han sido utilizados para validar el uso de
15 compuestos que modulan RAGE como terapéuticos. Ejemplos de estos modelos son como sigue:

- a) sRAGE inhibió formación neoíntima en un modelo de rata de restenosis después de lesión arterial en ambas ratas diabéticas y normales al inhibir activación endotelial, de músculo liso y macrofaga a través de RAGE (Zho, *Circulation* 107: 2238-2243
20 (2003));
- b) Inhibición de interacciones RAGE/ligandos, utilizando ya se sRAGE o un anticuerpo anti-RAGE, formación de placas amiloides reducida en un modelo murino de amiloidosis sistémica (Yan, *Nat. Med.*, 6:643-651 (2000)). Acompañar la reducción en placas amiloides fue una reducción en las citoquinas inflamatorias, interleucina-6
25 (IL-6) y factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF) así como también activación reducida de NF-κB en los animales tratados;
- c) Ratones transgénicos RAGE (sobrexpresores RAGE y expresadores negativos dominantes RAGE) exhiben formación de placas y déficits cognitivos en un modelo murino de AD (Arancio, *EMBO J.*, 23:4096-4105 (2004));
- 30 d) El tratamiento de ratas diabéticas con sRAGE redujo la permeabilidad vascular (Bonnardel-Phu, *Diabetes*, 48:2052-2058 (1999));
- e) El tratamiento con sRAGE redujo las lesiones ateroscleróticas en ratones diabéticos deficientes de apolipoproteína E y previno los índices funcionales y morfológicos de

209
208

nefropatía diabética en ratones db/db (Hudson, *Arch. Biochem. Biophys.*, 419: 80-88 (2003)); y

- 5 f) sRAGE atenuó la exactitud de inflamación en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (Hofmann, *Genes Immunol.*, 3:123-135 (2002)), un modelo murino de encefalomiелitis alérgica experimental (Yan, *Nat. Med.* 9:28-293 (2003)) y un modelo murino de enfermedad intestinal inflamatoria (Hofmann, *Cell*, 97:889-901 (1999)).

10 Así, en una realización, las proteínas de fusión del presente invento se pueden utilizar para tratar un síntoma de diabetes y/o complicaciones que resultan a partir de diabetes mediada por RAGE. En realizaciones alternas, el síntoma de diabetes o complicaciones tardías diabéticas pueden comprender nefropatía diabética, retinopatía diabética, una úlcera de pie diabético, una complicación cardiovascular de diabetes, o neuropatía diabética.

15 Originalmente identificado como un receptor para moléculas cuya expresión es asociada con la patología de diabetes, RAGE mismo es esencial para la patofisiología de complicaciones diabéticas. *In vivo*, la inhibición de interacción RAGE con sus ligandos ha sido mostrada como terapéutica en múltiples modelos de complicaciones diabéticas e inflamación (Hudson, *Arch. Biochem. Biophys.*, 419:80-88 (2003)). Por ejemplo, un tratamiento de dos meses con anticuerpos anti-RAGE normalizó la función renal y redujo histopatología renal anormal en ratones diabéticos (Flyvbjerg, *Diabetes* 53: 166-172 (2004)). Además, el tratamiento con una forma soluble de RAGE (sRAGE) el cual se fija a ligandos RAGE e inhibe interacciones RAGE/ligando, redujo lesiones ateroscleróticas en ratones diabéticos deficientes de apolipoproteína E y atenuó la patología funcional y formológica de nefropatía diabética en ratones db/db (Bucciarelli, *Circulación* 106:2827-2835 (2002)).

25 También, se ha mostrado que la glicoxidación no enzimática de macromoléculas finalmente resultando en la formación de productos finales avanzados glicosilados (AGEs) es aumentada en sitios de inflamación, en falla renal, en la presencia de hiperglicemia y otras condiciones asociadas con estrés sistemático u oxidante local (Dyer, *J. Clin. Invest.*, 91:2463-2469 (1993); Reddy, *Biochem.*, 34:10872-10878 (1995); Dyer, *J. Biol. Chem.*, 266: 11654-11660 (1991); Degenhardt, *Cell Mol. Biol.*, 44:1139-1145 (1998)). La acumulación de AGEs en la vasculature puede ocurrir de manera focal, como en el caso de amiloide conjunta compuesta de AGE- β 2-microglobulina encontrada en paciente con amiloidosis relacionada con diálisis (Miraya, *J. Clin. Invest.*, 92: 1243-1252 (1993); Miyata, *J. Clin. Invest.*, 98:1088-1094 (1996)), o generalmente, como ejemplificada por la vasculatura y tejidos de pacientes con diabetes (Schmidt, *Nature Med.*, 1:1002-1004 (1995)). La acumulación progresiva de AGEs en el tiempo en pacientes con diabetes indica que los mecanismos de eliminación

20
201

endógena no pueden funcionar de manera efectiva en sitios de deposición AGE. Tales AGEs acumulados tienen la capacidad de alterar las propiedades celulares mediante un número de mecanismos. Aunque RAGE se expresó a bajos niveles en tejidos normales y vasculatura, en un ambiente donde los ligados de receptores se acumulan, se ha mostrado que RAGE se vuelve regulada hacia arriba (Li, *J. Biol. Chem.* 272:16498-16506 (1997); *J. Biol. Chem.*, 273:30870-30878 (1998); Tanaka *J. Biol. Chem.*, 275:25781-25790 (2000)). La expresión RAGE es aumentada en endotelio, células de músculo liso e infiltración fagocitos mononucleares en vasculatura diabética. También, los estudios en cultivo celular han demostrado que la interacción AGE-RAGE produce cambios en propiedades celulares importantes en homeostasis vascular.

El uso de proteínas de fusión RAGE en el tratamiento de patología relacionada con diabetes se ilustra en la Fig. 13. La proteína de fusión RAGE TTP-4000 fue evaluada en un modelo de rata diabética de restenosis el involucró medición de proliferación de músculo liso y expansión intima después de lesión vascular. Como se ilustró en la Figura 13, el tratamiento TTP-4000 puede reducir significativamente la proporción intima/media (I/M) (Fig. 13A; Tabla 1) en restenosis asociada con diabetes en una forma sensible a dosis. También, el tratamiento TTP-4000 puede significativamente reducir proliferación de células de músculo liso vascular asociada con restenosis en una forma sensible a dosis.

Tabla 1
Efecto de TTP-4000 en Modelo de Rata de Restenosis

	IgG (n=9)	TTP-4000 (n=9)	TTP-4000 (n=9) Dosis alta** (1.0 mg/animal qod x 4)
Área luminal (mm ²)	0.2 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.16 ± 0.02
Área medial (mm ²)	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01
Proporción I/M	1.71 ± 0.27	1.61 ± 0.26	1.44* ± 0.15

** Tanto para dosis alta como baja, se utilizo una dosis de carga de 3 mg/animal.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión del presente invento también se pueden utilizar para tratar o revertir amiloidosis y enfermedad de Alzheimer. RAGE es un receptor

para amiloide beta ($A\beta$) así como también otras proteínas amiloidogénicas incluyendo SAA y amilina (Yan, *Nature*, 382:685-691 (1996); Yan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:5296-5301 (1997); Yan *Nat. Med.*, 6: 643-651 (2000); Sousa, *Lab Invest.*, 80:1101-1110 (2000)).

También, los ligandos RAGE, incluyendo AGEs, S100b y proteínas $A\beta$, son encontrados en
 5 tejido que rodea la placa senil en el hombre (Luth, *Cereb. Cortex* 15:211-220 (2005); Petzold, *Neurosci. Lett*, 336:167-170 (2003); Sasaki, *Brain Res.*, 12:256-262 (2001); Yan, *Restor. Neurol Neurosci.*, 12:167-173 (1998)). Se ha mostrado que RAGE fija material fibrilar de lamina- β sin importar la composición de las subunidades (péptido amiloide- β , amilina, amiloide en suero A, péptido prion-derivado) (Yan, *Nature*, 382:685-691 (1996); Yan., *Nat.*
 10 *Med.*, 6:643-651 (2000)). Además, se ha mostrado que la amiloide resulta en expresión aumentada de RAGE. Por ejemplo, en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD), la expresión de RAGE aumenta en neuronas y glia (Yan, *Nature* 382:685-691 (1996)). Concurrente con expresión de ligandos RAGE, RAGE es regulado de manera positiva en astrositos y células microgliales en el hipocampo de individuos con AD pero no es regulado
 15 de manera positiva en individuos que no tienen AD (Lue, *Exp. Neurol.*, 171:29-45 (2001)). Estos hallazgos indican que las células que expresan RAGE son activadas a través de interacciones RAGE/ligando RAGE en la proximidad de la placa senil. También, *In Vitro*, la activación mediada por $A\beta$ de células microgliales se puede bloquear con anticuerpos dirigidos contra el dominio de unión de ligandos de RAGE (Yan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
 20 94:5296-5301 (1997)). Se ha demostrado que RAGE puede servir como un punto focal para ensamble fibril (Deane, *Nat. Med.* 9:907-913 (2003)).

También, la inhibición *in vivo* de interacciones RAGE/ligandos utilizando ya sea sRAGE o un anticuerpo antiRAGE puede reducir la formación de placa amiloide en un modelo murino de amiloidosis sistemática (Yan, *Nat. Med.*, 6:643-651 (2000)). Los ratones
 25 transgénicos dobles que sobre-expresan RAGE humano y proteína precursora amiloide humana (APP) con las mutaciones Swedish y London (hAPP mutante) en neuronas desarrollan defectos de aprendizaje y anormalidades neuropatológicas más temprano que sus contrapartes transgénicas hAPP mutantes simples. En contraste, los ratones transgénicos dobles con capacidad de señalización $A\beta$ disminuida debida a neuronas que expresan una
 30 forma negativa dominante de RAGE sobre el mismo fondo hAPP mutante, muestran un comienzo retardado de anormalidades neuropatológicas y de aprendizaje en comparación con su contraparte transgénica APP simple (Arancio, *EMBO J.* 23:4096-4105 (2004)).

212.
212

Además, se ha mostrado que la inhibición de interacción RAGE-amiloide disminuye expresión de RAGE celular y marcadores de estrés celular (así como también activación NF- κ B), disminuyen deposición amiloide (Yan, *Nat. Med.*, 6:643-651 (2000)) indicando un rol para interacción RAGE-amiloide tanto en perturbación de propiedades celulares en un ambiente enriquecido para amiloide (aún en etapas tempranas) así como también en acumulación amiloide.

Por lo tanto, las proteínas de fusión RAGE del presente invento se pueden utilizar también para reducir amiloidosis y para reducir placas amiloides y disfunción cognitiva asociada con Enfermedad de Alzheimer (AD por su sigla en inglés). Como se describió anteriormente, se ha mostrado que sRAGE reduce tanto la formación de placa amiloide en el cerebro como el aumento subsecuencia en marcadores inflamatorios en un modelo animal de AD. Las figuras 14A y 14B muestran que los ratones que tienen AD, y son tratados durante 3 meses con ya sea TTP-4000 o sRAGE de ratón tuvieron menos placas beta amiloide ($A\beta$) y menos disfunción cognitiva que los animales que recibieron un vehiculo o un control negativo IgG humano (IgG1). Como sRAGE, TTP-4000 también puede reducir las citoquinas inflamatorias IL-1 y TNF- α (no se muestran datos) asociadas con AD.

También, las proteínas del presente invento se pueden utilizar para tratar aterosclerosis y otros trastornos cardiovasculares. Por lo tanto, se ha mostrado que la enfermedad cardíaca isquémica es particularmente alta en pacientes con diabetes (Robertson, *Lab Invest.*, 18:538-551 (1968); Kannel, *J. Am. Assoc.*, 241:2038 (1979); Kannel, *Diab. Care*, 2:120-126 (1979)). Además, los estudios han mostrado que la aterosclerosis en pacientes con diabetes es más acelerada y extensiva que en pacientes que no padecen de diabetes (ver ej., Waller *Am. J. Med.*, 69:498-506 (1980); Crall, *Am. J. Med.* 64:221-230 (1978); Hamby, *Chest*, 2:251-257 (1976); y Pyorala, *Diab. Metab. Rev.*, 3:463-524 (1978)). Aunque las razones para aterosclerosis acelerada en el entorno de la diabetes son muchas, se ha mostrado que la reducción de AGEs puede reducir la formación de placa.

Por ejemplo, las proteínas de fusión RAGE del presente invento también se pueden utilizar para tratar apoplejía. Cuando TTP-4000 se comparó con sRAGE en un modelo animal patológicamente relevante de apoplejía, se encontró que TTP-4000 proporciona una reducción significativamente mayor en volumen de infarto. En este modelo, la arteria carotida media de un ratón es ligada y luego sometida a reperusión para formar un infarto. Para evaluar la eficacia de las proteínas de fusión RAGE para tratar apoplejía, los ratones fueron tratados con sRAGE o TTP-4000 o inmunoglobulina de control justo antes de la reperusión. Como se puede observar en la Tabla 2, TTP-4000 fue más eficaz que sRAGE para limitar el área de

213
22

infarto en estos animales indicando que TTP-4000, debido a su mejor vida media en plasma, fue capaz de mantener mayor protección que sRAGE.

Tabla 2

5 Reducción de Infarto en Apoplejía

	% de reducción de infarto**
sRAGE	15%
TTP-4000 (300 µg)	38%
TTP-4000 (300 µg)	21%
TTP-4000 (300 µg)	10%
IgG isotipo control (300 µg)	4%

* significativo para $p < 0.001$; ** comparada con sustancia salina.

En otra realización, las proteínas de fusión del presente invento se pueden utilizar para tratar cáncer. En una realización, el cáncer tratado utilizando las proteínas de fusión del presente invento comprende células de cáncer que expresan RAGE. Por ejemplo, los cánceres que pueden ser tratados con la proteína de fusión RAGE del presente invento incluyen algunos cánceres pulmonares, algunos gliomas, algunos papilomas, y similares. Anfoterina es una proteína fijadora de ADN cromosómico grupo I no-histona de alta movilidad (Rauvala, *J. Biol. Chem.*, 262:16625-16635 (1987); Parkikinen, *J. Biol. Chem.* 268:19726-19738 (1993)) la cual ha sido mostrada por interactuar con RAGE. Se ha mostrado que anfoterina promueve el sobrecrecimiento de neuritas, así como también sirve como una superficie para ensamblar complejos de proteasa en el sistema fibrinolítico (también conocido para contribuir con movilidad celular). Además, se ha observado un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral local de bloquear RAGE en un modelo tumoral primario (C6 glioma), el modelo de metastasis pulmonar de Lewis (Tagichi, *Nature* 405:354-360 (2000)), y papilomas de surgimiento espontaneo en ratones expresando el transgene v-Ha-ras (Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9178-9182 (1990)).

En aún otra realización, las proteínas de fusión del presente invento se pueden utilizar para tratar inflamación. Por ejemplo, en realizaciones alternas, la proteína de fusión del presente invento se utiliza para tratar inflamación asociada con autoinmunidad, inflamación asociada con enfermedad intestinal inflamatoria, inflamación asociada con artritis reumatoide, inflamación asociada con psoriasis, inflamación asociada con esclerosis múltiple, inflamación asociada con hipoxia, inflamación asociada con hipoplejía, inflamación asociada con ataque

24.
23

cardiaco, inflamación asociada con choque hemorrágico, inflamación asociada con sepsis, inflamación asociada con trasplante de órganos, o inflamación asociada con curación deteriorada de heridas.

5 Por ejemplo, después de tratamiento trombolítico, células inflamatorias tales como
granulocitos infiltran el tejido isquémico y producen radicales de oxígeno que pueden destruir
más células que las eliminadas por la hipoxia. Se ha mostrado que inhibir el receptor sobre el
neutrófilo responsable de los neutrófilos capaz de infiltrar el tejido con anticuerpos u otros
antagonistas de proteínas alivia la respuesta. Puesto que RAGE es un ligando para este
10 receptor de neutrófilos, una proteína de fusión que contiene un fragmento de RAGE puede
actuar como un señuelo y evitar que el neutrófilo se desplace hacia el sitio reperfundido y así
evitar destrucción adicional de tejidos. El papel de RAGE en prevención de inflamación se
puede indicar por estudios que muestran que sRAGE inhibió expansión neointima en un
modelo de rata de restenosis después de lesión arterial tanto en ratas diabéticas como
15 normales, presumiblemente al inhibir proliferación de células endoteliales, de músculo liso y
activación de macrófagos a través de RAGE (Zhou, *Circulación*, 107:2238-2243 (2003)).
Además, sRAGE inhibió modelos de inflamación incluyendo hipersensibilidad tipo retardada,
encefalitis autoinmune experimental y enfermedad intestinal inflamatoria (Hofman, *Cell*,
97:889-901 (1999)).

También, en una realización, las proteínas de fusión del presente invento se pueden
20 utilizar para tratar trastornos de base autoinmune. Por ejemplo, las proteínas de fusión del
presente invento se pueden utilizar para tratar falla renal. Así, las proteínas de fusión del
presente invento se pueden utilizar para tratar nefritis por lupus sistémico o nefritis por lupus
inflamatorio. Por ejemplo, se ha mostrado que S100/calgranulinas comprende una familia de
25 polipéptidos fijadores de calcio estrechamente relacionados caracterizados por dos regiones
de mano EF unidas por un péptido de conexión (Schafer, *TIBS*, 21: 134-140 (1996); Zimmer,
Brain Res. Bull., 37:417-429 (1995); Rammes, *J. Biol. Chem.*, 272:9496-9502 (1997);
Lugering, *Eur. J. Clin. Invest.*, 25:659-664 (1995)). Aunque carecen de péptidos señal, se ha
sabido durante mucho tiempo que S100/calgranulinas ganan acceso al espacio extracelular,
especialmente en sitios de respuestas inmunes/inflamatorias crónicas, como en fibrosis cística
30 y artritis reumatoide. RAGE es un receptor para muchos miembros de la familia
S100/calgranulina, que media sus efectos proinflamatorios sobre células tales como linfocitos
y fagocitos mononucleares. También, los estudios sobre respuesta de hipersensibilidad tipo
retardado, colitis en ratones deficientes de IL-10, artritis inducida por colágeno, y modelos de
encefalitis autoinmune experimental indican que la interacción RAGE-ligando

(presumiblemente con S-100/calgranulinas) tiene un papel proximal en la cascada inflamatoria.

215
214

Por lo tanto, en varias realizaciones seleccionadas, el presente invento puede proporcionar un método para inhibir la interacción de un AGE con RAGE en un sujeto administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión del presente invento. El sujeto tratado que utiliza las proteínas de fusión RAGE del presente invento puede ser un animal. En una realización, el sujeto es un humano. El sujeto puede estar padeciendo de una enfermedad relacionada con AGE tal como diabetes, las complicaciones diabéticas tales como nefropatía, neuropatía, retinopatía, ulcera de pie, amiloidosis, o falla renal, e inflamación. O, el sujeto puede ser un individuo con enfermedad de Alzheimer. En una realización alternativa, el sujeto puede ser un individuo con cáncer. En aún otras realizaciones, el sujeto puede estar sufriendo de lupus sistémico eritematoso o nefritis de lupus inflamatorio. Otras enfermedades pueden ser mediadas por RAGE y por lo tanto, se pueden tratar utilizando proteínas de fusión del presente invento. Por lo tanto, en realizaciones alternativas adicionales del presente invento, las proteínas de fusión se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedad de Crohn, artritis, vasculitis, neuropatías, retinopatías, y neuropatías en sujetos humanos o animales.

Una cantidad terapéuticamente efectiva puede comprender una cantidad capaz de prevenir la interacción de RAGE con un AGE u otros tipos de ligandos RAGE endógenos en un sujeto. Por consiguiente, la cantidad variará con el sujeto siendo tratado. La administración del compuesto puede cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente, o como un evento simple. En varias realizaciones alternativas, la cantidad efectiva de la proteína de fusión puede estar en el rango entre 1 ng/kg de peso y aproximadamente 100 mg/kg de peso, o entre 10 ug/kg de peso y aproximadamente 50 mg/kg de peso, o entre aproximadamente 100 ug/kg de peso y aproximadamente 10 mg/kg de peso. La cantidad efectiva actual se puede establecer mediante ensayos dosis/respuesta utilizando métodos estándares en el estado de la técnica (Jonson, *Diabetes*. 42:1179, (1993)). Así, como se conoce por aquellos en el estado de la técnica, la cantidad efectiva puede depender de la biodisponibilidad, bioactividad, y biodegradabilidad del compuesto.

Composiciones

El presente invento puede comprender una composición que comprende una proteína de fusión del presente invento mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La proteína de fusión puede comprender un polipéptido RAGE unido a un segundo polipéptido

26.
25

no RAGE. En una realización, la proteína de fusión puede comprender un sitio de unión de ligandos RAGE. En una realización, el sitio de unión de ligandos RAGE comprende el dominio más N-terminal de la proteína de fusión. El sitio de unión de ligandos RAGE puede comprender el dominio V de RAGE, o una porción del mismo. En una realización, el sitio de unión de ligandos RAGE comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia 90% idéntica a la misma, o SEQ ID NO: 10 o una secuencia 90% idéntica a la misma.

En una realización, el polipéptido RAGE puede estar unido a un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción (ej., un fragmento del mismo) de un dominio de inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina comprende al menos una porción de al menos uno de los dominios CH2 o CH3 de una IgG humano.

La proteína RAGE o polipéptido puede comprender RAGE humano de longitud completa (ej., SEQ ID NO: 1), o un fragmento de RAGE humano. En una realización, el péptido RAGE no incluye ningún residuo de secuencia de señal. La secuencia de señal de RAGE puede comprender residuos 1-22 o residuos 1-23 o RAGE de longitud completa (SEQ ID NO:1). En realizaciones alternas, el polipéptido RAGE puede comprender una secuencia que es 70%, 80% o 90% idéntica a RAGE humano, o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido RAGE puede comprender RAGE humano, o un fragmento del mismo, con Glicina como el primer residuo en cambio de Metionina (ver ej., Beeper, (1992)). O, el RAGE humano puede comprender RAGE de longitud completa con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3) (Figs. 1A y 1B) o una porción de esa secuencia aminoácida. Las proteínas de fusión del presente invento también comprenden sRAGE (ej., SEQ ID NO: 4), un polipéptido 90% idéntico a sRAGE, o un fragmento de sRAGE. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender sRAGE humano, o un fragmento del mismo, con Glicina como el primer residuo en cambio de metionina (ver ej., Beeper (1992)). O, el RAGE humano puede comprender sRAGE con la secuencia de señal retirada (ej., SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) (Fig. 1C) o una porción de esa secuencia aminoácida. En otras realizaciones, la proteína RAGE puede comprender un dominio V (ej., SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; Fig. 1D). O se puede utilizar una secuencia 90% idéntica al dominio V o un fragmento del mismo. O la proteína RAGE puede comprender un fragmento de RAGE que comprende una porción del dominio V (ej., SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. Fig. 1D). En una realización, el sitio de unión de ligandos puede comprender SEQ ID NO: 9. o una secuencia 90% idéntica a la misma, o SEQ ID NO: 10, o una secuencia 90% idéntica a la misma. En aún otra realización, el fragmento RAGE es un péptido sintético.

217
216

Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-116 de RAGE humano (SEQ ID NO: 7) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o aminoácidos 24-116 de RAGE humano (SEQ ID NO:8) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde al dominio V de RAGE. O el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 124-221 de RAGE humano (SEQ ID NO: 11) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde al dominio C1 de RAGE. En otra realización, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 227-317 de RAGE humano (SEQ ID NO:12) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde al dominio C2 de RAGE. O, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-123 de RAGE humano (SEQ ID NO:13) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o los aminoácidos 24-123 de RAGE humano (SEQ ID NO: 14) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde al dominio V de RAGE y un enlazador de interdominio corriente abajo. O el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-226 de RAGE humano (SEQ ID NO: 17) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde al dominio V, el dominio C1 y el enlazador de interdominio que une estos dos dominios. O, el polipéptido RAGE comprende los aminoácidos 23-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 5) o un fragmento 90% idéntico del mismo, o 24-339 de RAGE humano (SEQ ID NO: 6) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde a sRAGE (es decir, que codifica los dominios V, C1, y C2 y enlazadores de interdominio). O se pueden utilizar fragmentos de cada una de estas secuencias.

La proteína de fusión puede incluir varios tipos de péptidos que no se derivan de RAGE o un fragmento del mismo. El segundo péptido de la proteína de fusión puede comprender un polipéptido derivado de una inmunoglobulina. La cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar a partir de cualquiera de los isotipos de cadena pesada conocidos: IgG (γ), IgM(γ), IgM(μ), IgD(δ), IgE (ϵ), o IgA (α). Además, la cadena pesada (o porción de la misma) se puede derivar a partir de cualquiera de los subtipos de cadena pesada conocida: IgG1(γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), o mutaciones de estos isotipos o subtipos que alteran la actividad biológica. El segundo polipéptido puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana o porciones de cualquiera, o ambos, de estos dominios. Como una realización de ejemplo, El polipéptido comprendiendo los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana o una porción del mismo puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40. El péptido de inmunoglobulina se puede codificar mediante la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.

218

La porción Fc de la cadena de inmunoglobulina puede ser proinflamatoria *in vivo*. Por lo tanto, la proteína de fusión RAGE del presente invento comprende un enlazador de interdominio derivado de RAGE en cambio de un polipéptido de bisagra de interdominio derivado de una inmunoglobulina.

5 Así en una realización, la proteína de fusión puede además comprender un polipéptido RAGE directamente unido a un polipéptido que comprende un dominio CH2 de una inmunoglobulina, o un fragmento del mismo. En una realización, el dominio CH2, o un fragmento del mismo comprende SEQ ID NO: 42.

10 En una realización, el polipéptido RAGE comprende un enlazador de interdominio RAGE unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE tal que el aminoácido C-terminal del dominio de inmunoglobulina RAGE está unido al aminoácido N-terminal del enlazador de interdominio, y el aminoácido C-terminal del enlazador de interdominio RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal de un polipéptido que comprende un dominio CH2 de una inmunoglobulina, o un fragmento de la misma. El polipéptido comprendiendo un
15 dominio CH2 de una inmunoglobulina, o una porción del mismo, puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana. Como una realización de ejemplo, el polipéptido que comprende los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana puede comprender SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40.

20 La proteína de fusión del presente invento puede comprender dominios simples o múltiples a partir de RAGE. También, el polipéptido RAGE que comprende un enlazador de interdominio unido a un dominio de inmunoglobulina RAGE puede comprender un fragmento de una proteína RAGE de longitud completa. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión puede comprender dos dominios de inmunoglobulina derivados de la proteína RAGE y dos dominios de inmunoglobulina derivados de un polipéptido Fc humano. La proteína de
25 fusión puede comprender un dominio de inmunoglobulina RAGE y un primer enlazador de interdominio unido a un segundo dominio de inmunoglobulina RAGE y un segundo enlazador de interdominio RAGE, tal que el aminoácido N-terminal del primer enlazador de interdominio está unido al aminoácido C-terminal del primer dominio de inmunoglobulina RAGE, el aminoácido N-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina RAGE está unido
30 al aminoácido C-terminal del primer enlazador de interdominio, el aminoácido M-terminal del segundo enlazador de interdominio está ligado al aminoácido C-terminal del segundo dominio de inmunoglobulina RAGE, y el aminoácido C-terminal del segundo enlazador de interdominio RAGE está directamente unido al aminoácido N-terminal del polipéptido comprendiendo un dominio de inmunoglobulina CH2 o un fragmento del mismo. Por

ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 19) o una secuencia 90% idéntica a la misma, o aminoácidos 24-251 de RAGE humano (SEQ ID NO: 20) o una secuencia 90% idéntica a la misma, que corresponde al dominio V, el dominio C1, el enlazador de interdominio que une estos dos dominios, y un
5 segundo enlazador de interdominio corriente abajo de C1. En una realización, un constructo de ácido nucleico comprendiendo SEQ ID NO: 30 o un fragmento del mismo puede codificar una proteína de fusión RAGE de cuatro dominios.

Alternativamente, una proteína de fusión de tres dominios puede comprender un dominio de inmunoglobulina derivado de RAGE y dos dominios de inmunoglobulina
10 derivados de un polipéptido Fc humano. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un dominio de inmunoglobulina RAGE simple unido a través de un enlazador de interdominio RAGE al aminoácido N-terminal del polipéptido comprendiendo un dominio de inmunoglobulina CH2 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el polipéptido RAGE puede comprender los aminoácidos 23-136 de RAGE humano (SEQ ID NO: 15) o una secuencia
15 90% idéntica a la misma que corresponde al dominio V de RAGE y un enlazador de interdominio corriente abajo. En una realización, un constructo de ácido nucleico comprendiendo SEQ ID NO: 31 o un fragmento del mismo puede codificar una proteína de fusión RAGE de tres dominios.

Un fragmento enlazador de interdominio RAGE puede comprender una secuencia
20 péptida que está naturalmente corriente debajo de, y por lo tanto, está unida a, un dominio de inmunoglobulina RAGE. Por ejemplo, para el dominio RAGE V, el enlazador de interdominio puede comprender secuencias aminoácidas que están naturalmente corriente abajo del dominio V. En una realización, el enlazador puede comprender SEQ ID NO: 21, que corresponde a los aminoácidos 117-123 de RAGE de longitud completa. O, el enlazador
25 puede comprender un péptido que tiene porciones adicionales de la secuencia RAGE natural. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador de interdominio que comprende varios aminoácidos (ej., 1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos) corriente arriba y corriente debajo de SEQ ID NO: 21. Por lo tanto, en una realización, el enlazador de interdominio comprende SEQ ID NO: 23 comprendiendo aminoácidos 117-136 de RAGE de longitud completa. O se
30 pueden utilizar fragmentos de SEQ ID NO: 21 suprimiendo, por ejemplo, 1, 2, o 3 aminoácidos de cualquier extremo del enlazador. En realizaciones alternas, el enlazador puede comprender una secuencia que es 70% idéntica, u 80% idéntica, o 90% idéntica a SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 23.

Para el dominio RAGE C1, el enlazador puede comprender la secuencia peptídico que está naturalmente corriente abajo del dominio C1. En una realización, el enlazador puede comprender SEQ ID NO: 22, que corresponde a los aminoácidos 222-251 de RAGE de longitud completa. O, el enlazador puede comprender un péptido que tiene porciones
5 adicionales de la secuencia RAGE natural. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador que comprende varios aminoácidos (1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos) corriente arriba y corriente debajo de SEQ ID NO: 22. O se puede utilizar fragmentos de SEQ ID NO: 22, suprimiendo por ejemplo 1-3, 1-5, o 1-10, o 1-15 aminoácidos desde cualquier extremo del enlazador. Por ejemplo, en una realización, un enlazador de interdominio RAGE puede
10 comprender SEQ ID NO: 24, que corresponde a los aminoácidos 222-226. O un enlazador de interdominio puede comprender SEQ ID NO: 44, que corresponde a los aminoácidos RAGE 318-342.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender cualquiera de los vehículos farmacéuticamente estándares conocidos en el estado de la técnica. El vehículo
15 puede comprender un diluyente. En una realización, el vehículo farmacéutico puede ser un líquido y la proteína de fusión o constructo de ácido nucleico puede estar en la forma de una solución. En otra realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido en la forma de un polvo, un polvo liofilizado o una tableta. O, el vehículo farmacéutico puede ser un gel, supositorio, o crema. En realizaciones alternas, el vehículo puede comprender un
20 liposoma, una microcápsula, una célula encapsulada por polímero, o un virus. Así, el termino vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no está limitado a, cualquiera de los vehículos farmacéuticamente aceptados estándares, tales como agua, alcoholes, solución salina amortiguada con fosfato, azúcares (ej., sacarosa o manitol), aceites o emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua o una emulsión de triglicéridos, varios tipos de agentes
25 humectantes, tabletas, tabletas recubiertas y cápsulas.

La administración de las proteínas de fusión RAGE del presente invento puede emplear varias rutas. Así, la administración de la proteína de fusión RAGE del presente invento puede emplear inyección intraperitoneal (IP). Alternativamente, la proteína de fusión RAGE se puede administrar de manera oral, intranasal, o como un aerosol. En otra
30 realización, la administración es intravenosa (IV). La proteína de fusión RAGE también se puede inyectar subcutáneamente. En otra realización, la administración de la proteína de fusión es intra-arterial. En otra realización, la administración es sublingual. También, la administración puede emplear un capsula de crono liberación. En aún otra realización, la administración puede ser transrectal, por medio de un supositorio por ejemplo o similares. Por

22
230

ejemplo, la administración subcutánea puede ser útil para tratar trastornos crónicos cuando auto-administración es deseable.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una solución estéril inyectable en un solvente o vehículo parenteralmente aceptable no tóxico. Entre los vehículos
5 y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, solución de Ringer, 3-butanediol, solución de cloruro de sodio isotónico, o buffers acuosos, como por ejemplo, citrato fisiológicamente aceptable, acetato, glicina, histidina, fosfato, buffers tris o succinatos fisiológicamente aceptables. La solución inyectable puede contener estabilizadores para proteger contra degradación química y formación de agregados. Los estabilizadores pueden
10 incluir antioxidantes tales como hidroxilo animosa butilada (BHA), tolueno hidroxil butilado (BHT), buffers (citratos, glicina, histidina) o surfactantes (polisorbato 80, poloxameros). La solución también puede contener preservativos antimicrobiales, tales como alcohol bencílico y parabenos. La solución también puede contener surfactantes para reducir agregación, tal como Polisorbato 80, poloxomero, u otros surfactantes conocidos en el estado de la técnica.
15 La solución también puede contener otros aditivos, tales como un azúcar o solución salina, para ajustar la presión osmótica de las composiciones para ser similares a la sangre humana.

Las composiciones pueden estar en la forma de un polvo liofilizado estéril para inyección ante reconstitución con un diluyente. El diluyente puede ser agua para inyección, agua bacteriostática para inyección, o solución salina estéril. El polvo liofilizado se puede
20 producir mediante secado por congelamiento de una solución de la proteína de fusión para producir la proteína en forma seca. Como se conoce en el estado de la técnica, la proteína liofilizada generalmente tiene estabilidad aumentada y una vida en almacenamiento mayor que una solución líquida de la proteína. El polvo liofilizado (torta) puede contener un buffer para ajustar el pH, como por ejemplo citrato fisiológicamente aceptable, acetato, glicina,
25 histidina, fosfato, buffer tris o succinato. El polvo liofilizado también puede contener lioprotectores para mantener su estabilidad física y química. Los lioprotectores comúnmente utilizados son azúcares no reductores y disacáridos tales como sacarosa, manitol, o trehalosa. El polvo liofilizado puede contener estabilizadores para proteger contra degradación química y formación de agregados. Los estabilizantes pueden incluir, pero no están limitados a
30 antioxidantes (BHA, BHT), buffers (citratos, glicina, histidina), o surfactantes (polisorbato 80, poloxameros). El polvo liofilizado también puede contener preservativos antimicrobianos, tales como alcohol bencílico y parabenos. El polvo liofilizado también puede contener surfactantes para reducir agregación, tal como, pero sin limitar a, Polisorbato 80 y poloxomero. El polvo liofilizado también puede contener aditivos (ej., azúcares o salina) para

ajustar la presión osmótica para ser similar a la sangre humana ante reconstitución del polvo. El polvo liofilizado también puede contener agentes aumentadores de volumen tales como azúcares y disacáridos.

5 Las composiciones farmacéuticas para inyección también pueden estar en la forma de una suspensión oleaginosa. Esta suspensión se puede formular según los métodos conocidos utilizando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión descritos anteriormente. Además, los aceites estériles, fijos son convenientemente empleados como solvente o médium de suspensión. Para este propósito, cualquier aceite fijo blando se puede emplear utilizando mono o diglicéridos sintéticos. También, las suspensiones aceitosas se
10 pueden formular al suspender el ingrediente activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de ajonjolí o aceite de maní, o en un aceite mineral tal como una parafina líquida. Por ejemplo, los ácidos grasos tales como ácido oléico encuentran uso en la preparación de inyectables. Las suspensiones aceitosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Estas composiciones
15 de pueden preservar mediante la adición de un anti-oxidante tal como ácido ascórbico.

Las composiciones farmacéuticas del presente invento también pueden estar en la forma de emulsiones aceite en agua o suspensiones acuosas. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo una parafina líquida, o una mezcla de estos. Agentes emulsificantes apropiados
20 pueden ser gomas de ocurrencia natural, por ejemplo goma acacia o goma tragacanto, fosfatidas de ocurrencia natural, por ejemplo semilla de soya, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitan, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo sorbitan de polioxietileno.

25 Las suspensiones acuosas también pueden contener los compuestos activos en combinación con excipientes. Tales excipientes pueden incluir agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto, y goma acacia; agentes dispersantes o humectantes, tales como una fosfatida de ocurrencia natural tal como lecitina, o productos de
30 condensación de un óxido alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetil-eneoicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres

223
522

parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitan de polietileno.

Polvos dispersables y gránulos apropiados para preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua pueden proporcionar el compuesto activo en combinación con un agente de dispersión, agente de suspensión, y uno o más preservativos. Los preservativos apropiados, agentes de dispersión, y agentes de suspensión son descritos mas adelante.

Las composiciones también pueden estar en la forma de supositorios para administración rectal de los compuestos del invento. Estas composiciones se pueden preparar al mezclar el fármaco con un excipiente no irritante apropiado el cual es sólido a temperaturas comunes pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y glicoles de polietileno, por ejemplo.

Para uso tópico, se pueden utilizar cremas, ungüentos, jaleas, soluciones o suspensiones que contienen los compuestos del invento. Las aplicaciones tópicas también pueden incluir lavados bucales y gargaras. Se pueden utilizar preservativos adecuados, antioxidantes tales como BHA y BHT, dispersantes, surfactantes, o buffers.

Los compuestos del presente invento también se pueden administrar en la forma de sistemas de liberación de liposomas, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesiculares unilaminares grandes, y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina, o fosfatidilcolinas.

En ciertas realizaciones, los compuestos del presente invento se pueden modificar para retardar adicionalmente la eliminación a partir de circulación mediante enzimas metabólicas. En una realización, los compuestos se pueden modificar mediante unión covalente de polímeros solubles en agua tales como glicol de polietileno (PEG), copolímeros de PEG y glicol de propileno, polivinilpirrolidona o poliprolina, celulosa de carboximetil, dextrana, alcohol polivinílico, y similares. Tales modificaciones también pueden aumentar la solubilidad del compuesto en solución acuosa. Polímeros tales como PEG puede ser covalentemente unidos a uno o más residuos amino reactivos, residuos de sulfhidrilo o residuos de carboxilo. Se han descrito numerosas formas activadas de PEG, incluyendo ésteres activos de ácido carboxílico o derivados de carbonato, particularmente aquellos en los cuales los grupos salientes son N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenceno-3-sulfona para reacción con grupos amino, derivados de multimodo o halo acetilo para reacción con grupos de sulfhidrilo, y amino hidracina o derivados de hidrazida para reacción con grupos de carbohidratos.

224
225

Métodos adicionales para preparación de formulaciones de proteínas los cuales se pueden utilizar con las proteínas de fusión del presente invento se describen en las Patentes U.S. No. 6.267.958, y 5-567-677.

En un aspecto adicional del presente invento, los moduladores RAGE del invento se utilizan en tratamientos terapéuticos adyuvantes o terapéuticos de combinación con otros agentes terapéuticos conocidos. El siguiente es un listado no exhaustivo de adyuvantes y agentes terapéuticos que se pueden utilizar en combinación con los moduladores de proteínas de fusión RAGE del presente invento.

Clasificación farmacológica de agentes anticancerígenos:

10

- 1. Agentes alquilantes: ciclofosfamida, nitrosoureas, carboplatina, cisplatina, procarbazona
- 2. Antibióticos: Bleomicina, Daunorubina, Doxorubicina
- 3. Antimetabolitos: Metotrexato, Citarabina, Flurouracil
- 4. Alcaloides vegetales: vinblastina, vincristina, etoposida, paclitaxel,
- 15 5. Hormonas: tamoxifen, acetato de oxtreotida, finasterida, flutamida
- 6. Modificadores de respuesta biológica: interferonas, interleuquinas,

Clasificaciones farmacológicas de tratamiento para artritis reumatoide

- 1. Analgésicos
- 20 2. NSAIDs (fármacos anti-inflamatorios no esteroideos): ibuprofen, naproxen, diclofenaco
- 3. DMARDs (fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad): metotrexato, preparaciones de oro, hidroxiquina, sulfasalazina
- 4. Modificadores de respuesta biológica, DMARDs: Etanercept, Glucocorticoides de
- 25 Infliximab

Clasificaciones farmacológicas de tratamiento para Diabetes Mellitus

- 1. Sulfonilureas: Tolbutamina, Tolazamina, Gliburida, Glipizida
- 2. Biguanidas: Metformina
- 30 3. Agentes orales misceláneos: Acarbosa, Troglitazona
- 4. Insulina

Clasificaciones Farmacológicas de tratamiento para Enfermedad de Alzheimer

- 1. Inhibidor de colinesterasa: tacrina, donepezil

- 2. Antipsicóticos: Haloperidol, tioridazina
- 3. Antidepresoras: desipramina, fluoxetina, trazodona, paroxetina
- 4. Anticovulsionantes: carbamazepina, ácido valproico

5 En una realización, el presente invento por lo tanto puede proporcionar un método para tratar enfermedades mediadas por RAGE, el método comprendiendo administración a un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión RAGE en combinación con agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consta de agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales, antibióticos, hormonas, 10 modificadores de respuesta biológica, analgésicos, NSAIDs, DMARDs, glucocorticoides, sulfonilureas, biguanidas, insulina, inhibidores de colinesterasa, antipsicóticos, antidepresores, y anticonvulsionantes. En una realización adicional, el presente invento proporciona la composición farmacéutica del invento como se describió anteriormente, que comprende uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consta de agentes 15 alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales, antibióticos, hormonas, modificadores de respuesta biológica, analgésicos, NSAIDs, DMARDs, glucocorticoides, sulfonilureas, biguanidas, insulina, inhibidores de colinesterasa, antipsicóticos, antidepresores, y anticonvulsivos.

20 **EJEMPLOS**

Las características y ventajas del concepto inventivo cubierto por el presente invento son ilustradas adicionalmente en los ejemplos que siguen.

25 **Ejemplo 1: Producción de Proteínas de Fusión RAGE-IgG Fc**

Se construyeron dos plásmidos para expresar proteínas de fusión RAGE-IgG Fc. Ambos plásmidos fueron contruidos al ligar diferentes longitudes de una secuencia cADN 5' a partir de RAGE humano con la misma secuencia cAD 3' de IgG Fc humana ($\gamma 1$). Luego estas secuencias de expresión (*es decir*, productos de ligación) fueron insertadas en el vector 30 de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen, CA). Las secuencias de ácido nucleico que codifican la región codificadora de proteína de fusión son mostradas en las Fig.s 2 y 3. Para la proteína de fusión TTP-4000, la secuencia de ácido nucleico a partir 1 a 753 (resaltada en negrilla) codifica la secuencia de proteína N-terminal RAGE, mientras la secuencia de ácido nucleico de 754 a 1386 codifica la secuencia de proteína IgG Fc (Fig. 2). Para TTP-3000, la secuencia

226
225

de ácido nucleico entre 1 y 408 (resaltada en negrilla) codifica la secuencia de proteína N-terminal RAGE, mientras la secuencia de ácido nucleico de 409 a 1041 codifica la secuencia de proteína IgG Fc (Fig. 3).

5 Para producir las proteínas de fusión RAGE, los vectores de expresión comprendiendo las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31 fueron transfectadas de manera estable en células CHO. Los transformantes positivos fueron seleccionadas para resistencia a neomicina conferida por el plásmido y fueron clonados. Clones de alta producción detectados por análisis Western Blot de sobrenadante fueron expandidos y el producto genético fue purificado mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de
10 Proteína A. La expresión se optimizó de manera que las células estuvieron produciendo TTP-4000 recombinante a niveles de 1.3 gramos aproximadamente por litro.

Los péptidos expresados que codifican las dos proteínas de fusión son ilustrados en las Figs. 4-6. Para la estructura de cuatro dominios de TTP-4000, los primeros 251 aminoácidos (mostrados en negrilla en la Fig. 4) contienen una secuencia de señal (1-22/23), el dominio de
15 inmunoglobulina V (y la unión de ligandos) (23/24-116), un segundo enlazador de interdominio (117-123), un segundo dominio de inmunoglobulina (CH1) (124-221), y un segundo enlazador (222-251) de la proteína RAGE humana (Figs. 4, 6B). La secuencia de 252 a 461 incluye los dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3 de IgG.

Para la estructura de tres dominios de TTP-3000, los primeros 136 aminoácidos
20 (mostrados en negrilla) contienen una secuencia de señal (1-22/23), el dominio de inmunoglobulina V (y la unión de ligandos) (23/24-116) y una secuencia de enlazador de interdominio (117-136) de la proteína RAGE humana (Figs. 5, 6B). Además, para TT3, la secuencia de 137 a 346 incluye los dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3 de IgG.

25 **Ejemplo 2: Método para probar actividad de una proteína de fusión RAGE-IgG1**

A. unión de ligandos in Vitro:

Ligandos RAGE conocidos fueron recubiertos sobre la superficie de placas Maxisorb a una concentración de 5 microgramos por pozo. Las placas fueron incubadas a 4°C durante la
30 noche. Después de incubación de ligandos, las placas fueron aspiradas y se agregó un buffer bloqueador de BSA al 1% en 50 mM de buffer de imidizol (pH 7.2) a las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego las placas fueron aspiradas y/o lavadas con buffer de lavado (20 mM imidizol, 150 mM NaCl, Tween-20 al 0.05%, 5 mM CaCl₂ y 5mM MgCl₂, pH 7.2). Se preparó una solución de TTP-3000 (TT3) a una concentración inicial de 1.082

mg/mL y una solución de TTP-4000 (TT4) a una concentración inicial de 370 ug/mL. La proteína de fusión se agregó a diluciones crecientes de la muestra inicial. La proteína de fusión RAGE se dejó incubar con el ligando inmovilizado a 37°C durante una hora después de lo cual la placa fue lavada y probada para la unión de la proteína de fusión. La unión fue
5 detectada mediante la adición de un complejo de inmunodetección que contiene una IgG1 antihumana de ratón monoclonal diluida 1:11.000 a una concentración de ensayo final (FAC por su sigla en inglés) de 21 ng/100 uL, una IgG anti-ratón de cabra biotinilado diluida 1:500, a una FAC de 500 ng/uL, y una fosfatasa alcalina unida a avidina. El complejo fue incubado con la proteína de fusión inmovilizada durante una hora a temperatura ambiente después de lo
10 cual la placa fue lavada y se agregó sustrato de fosfatasa alcalina *para*-nitrofenilfosfato (PNPP). La unión del complejo a la proteína de fusión inmovilizada fue cuantificada al medir la conversión de PNPP a *para*-nitrofenol (PNP) el cual se midió espectrofotométricamente a 405 nm.

Como se ilustró en la Fig. 7, las proteínas de fusión TTP-4000 (TT4) y TTP-3000
15 (TT3) específicamente interactúan con ligandos RAGE conocidos amiloide-beta (Abeta), S100b (S100), y anfoterita (Ampho). En ausencia de ligando, es decir, recubrimiento de BSA solo (BSA o BSA + lavado) no hubo incremento en absorbancia sobre niveles atribuibles a unión no específica del complejo de inmunodetección. Donde amiloide beta es utilizado como el ligando rotulado puede ser necesario preincubar el amiloide beta antes del ensayo. La
20 preincubación puede permitir que el amiloide beta se auto-agrege en la forma de lamina plateada, como amiloide beta puede preferencialmente fijarse a RAGE en la forma de una lámina plateada.

Evidencia adicional para una interacción específica entre proteínas de fusión RAGE TTP-4000 y TTP-3000 con ligandos RAGE es ejemplificada en estudios mostrando que un
25 ligando RAGE puede efectivamente competir con un ligando RAGE conocido para unión a las proteínas de fusión. En estos estudios, amiloide-beta (A-beta) fue inmovilizado sobre una placa Maxisorb y la proteína de fusión se agregó como se describió anteriormente. Además, un ligando RAGE fue agregado a algunos de los pozos al mismo tiempo que la proteína de fusión.

Se encontró que el ligando RAGE podría bloquear la unión de TTP-4000 (TT4) en
30 aproximadamente 25 a 30% donde TTP-4000 estuvo presente en 123 ug/mL (1:3 dilución, Fig. 8). Cuando la solución inicial de TTP-4000 fue diluida por un factor de 10 o 30 (1:10 o 1:30), la unión de la proteína de fusión al ligando inmovilizado fue completamente inhibida por el ligando RAGE. De manera similar, el ligando RAGE bloqueo la unión de TTP-3000

228
227

(TT3) en aproximadamente 50% donde TTP-3000 estuvo presente en 360 ug/mL (dilución 1:3, Fig. 9). Donde la solución inicial de TTP-3000 fue diluida por un factor de 10 (1:10), la unión de la proteína de fusión al ligando inmovilizado fue completamente inhibida por el ligando RAGE. Así, la especificidad de unión de la proteína de fusión RAGE al ligando RAGE fue dependiente de la dosis. También, como se muestra en las Figs 8 y 9, esencialmente no hubo unión detectada en ausencia de la proteína de fusión, *es decir*, utilizando solamente el complejo de inmunodetección ("complejo solo").

B. Efecto de proteínas de fusión RAGE en un ensayo basado en células

10

El trabajo previo ha mostrado que las células THP-1 mieloides pueden secretar TNF-alfa en respuesta a ligandos RAGE. En este ensayo, las células THP-1 fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10% utilizando el protocolo proporcionado por ATCC. Las células fueron inducidas para secretar TNF- α a través de estimulación de RAGE con 0.1 mg/ml S100b en ausencia y presencia de las proteínas de fusión TTP-3000 (TT3) o TTP-4000 (TT4) (10 ug), sRAGE (10 ug), y una IgG humano (10 ug) (*es decir*, como un control negativo). La cantidad de TNF- α secretado por las células THP-1 fue medida 24 horas después de la adición de las proteínas al cultivo celular utilizando un kit ELISA comercialmente disponible para TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los resultados en la Fig. 10 demuestran que las proteínas de fusión inhiben la producción de TNF- α inducida por S100b/RAGE en estas células. Como se muestra en la Fig. 10, ante la adición de 10 ug de proteínas de fusión TTP-3000 o TTP-4000, la inducción de TNF- α por S100b (0.1 mg/ml FAC) fue reducida en 45% a 70% respectivamente. La proteína de fusión TTP-4000 puede ser al menos tan efectiva para bloquear inducción S100b de TNF- α como sRAGE (Fig. 10). La especificidad de la inhibición para las secuencias RAGE de TTP-4000 y TTP-3000 es mostrada por el experimento en el cual IgG sola se agregó a células S100b estimuladas. La adición de IgG y S100b al ensayo muestra los mismos niveles de TNF- α que S100b solo. La especificidad de la inhibición de inducción de TNF- α mediante TTP-4000 y TTP-3000 para secuencias RAGE de la proteína de fusión es mostrada por el experimento en el cual IgG sola se agregó a células S100b estimuladas. Se puede observar que la adición de IgG, *es decir*, IgG humano sin la secuencia RAGE (IgG humano Sigma agregada a 10 ug/pozo), y S100b al ensayo muestra los mismos niveles de TNF- α que S100b solo.

229
200

Ejemplo 3: Perfil Farmacocinética de TTP-4000

Para determinar si TTP-4000 tendría un perfil farmacocinético superior en comparación con sRAGE humano, a ratas y primates no humanos se les dio una inyección intravenosa (IV) de TTP-4000 (5 mg/kg) y luego se evaluó el plasma para la presencia de TTP-4000. En estos experimentos dos monos macho naïve recibieron una dosis en bolo IV simple de TTP-4000 (5mg/ml/kg) en una vena periférica seguido por un flujo salino de 1.0 milímetros (mL). Se recolectaron muestras de sangre (aproximadamente 1.0 mL) antes de la dosis (es decir, antes de la inyección de TTP-4000), o a 0.083, 0.25, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 288, y 336 horas después de la dosis en tubos que contienen (heparina de litio). Después de la recolección, los tubos fueron colocados en hielo húmedo (máximo 30 minutos) hasta centrifugación bajo refrigeración (2 a 8°C) a 1500 x g durante 15 minutos. Cada muestra de plasma cosechado luego fue almacenada congelada (-70 °C ± 10°C) hasta la prueba para polipéptido RAGE utilizando una ELISA en varios puntos de tiempo después de inyección, como se describió en el Ejemplo 6.

El perfil cinético mostrado en la Fig. 11 revela que una vez TTP-4000 ha saturado sus ligandos como lo evidenció la pendiente claramente escalonada de la fase alfa en dos animales, este retiene una vida media terminal de mas de 300 horas. Esta vida media es significativamente mayor que la vida media de sRAGE humano en plasma (generalmente 2 horas aproximadamente) y proporciona una oportunidad para inyecciones simples para indicaciones agudas y semi-crónicas. En la Fig. 11 cada curva representa un animal diferente bajo las mismas condiciones experimentales.

Ejemplo 4: Activación de TTP-400 Fc

Los experimentos fueron realizados para medir la activación del receptor Fc mediante la proteína de fusión RAGE TTP-4000 en comparación con IgG humano. La activación de receptor Fc fue medida al medir la secreción de TNF-α a partir de células THP-1 que expresan el receptor Fc. En estos experimentos, una placa de 96 pozos fue recubierta con 10 ug/pozo de TTP-4000 o IgG humano. La estimulación Fc resulta en secreción TNF-α. La cantidad de TNF-α fue medida mediante un Ensayo Inmunosorbete Ligado a Enzima (ELISA).

Por lo tanto, en este ensayo, la línea celular mieloide, THP-1 (ATTC # TIB-202) fue mantenida en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% mediante instrucciones ATCC. Típicamente, 40.000-80.000 células por pozo fueron inducida para

230
229

secretar TNF- α a través de estimulación del receptor Fc al pre-recubrir el pozo con 10 ug/pozo de TTP-4000 calentado (63°C durante 30 min) o IgG1 humano. La cantidad de TNF- α secretada por las células THP-1 fue medida en sobrenadantes recolectados de cultivos de 24 horas de células en los pozos tratados utilizando un kit TNF ELISA comercialmente disponible (R&D Systems, Minneapolis, MN #DTA00C) por instrucciones.

Los resultados son mostrados en la Fig. 12 donde se puede observar que TTP-4000 genera menos de 2 ng/pozo TNF y IgG generó más de 40 ng/pozo.

Ejemplo 5: Actividad in vivo de TTP-4000

La actividad de TTP-4000 fue comparada con sRAGE en varios modelos *in vivo* de enfermedad humana.

A. TTP-4000 en un modelo animal de restenosis

La proteína de fusión RAGE TTP-4000 fue evaluada en un modelo de rata diabética de restenosis el cual involucró la medición de proliferación de músculo liso y expansión íntima 21 días después de lesión vascular. En estos experimentos, la lesión de globo de arteria carótida común izquierda fue realizada en ratas diabéticas y no diabéticas Zucker utilizando procedimiento estándar. Una dosis de carga (3 mg/rata) de IgG, TTP-4000 o solución salina amortiguada de fosfato (PBS) se administró intraperitonealmente (IP) un día antes de la lesión. Una dosis de mantenimiento fue liberada cada tercer día hasta el día 7 después de la lesión (es decir, el día 1, 3, 5, y 7 después de la lesión). La dosis de mantenimiento fue alta = 1 mg/animal para el primer grupo, o baja = 0.3 mg/animal para el segundo grupo. Para medir proliferación de células de músculo liso vasculares (VSMC por su sigla en inglés), los animales fueron sacrificados el día 4 y 21 después de la lesión.

Para la medición de proliferación celular, los animales del día 4 recibieron inyección intraperitoneal de bromodesoxiuridina (BrdU) 50 mg/kg a 18, 12, y 2 horas antes de la eutanasia. Después del sacrificio, las arterias carótidas izquierda y derecha enteras fueron cosechadas. Los especímenes fueron almacenados en Histochoice durante al menos 24 antes de fijar. La evaluación de proliferación VSMC fue realizada utilizando anticuerpo monoclonal anti-BrdU de ratón. Se aplicó un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra rotulado por fluorescencia. El número de núcleos BrdU-positivos por sección fue contado por dos observadores sin conocimiento de los regímenes de tratamiento.

231
250

Las ratas restantes fueron sacrificadas el día 21 para análisis morfométrico. Los análisis morfométricos fueron realizados por un observador sin conocimiento de los grupos de estudio, utilizando software de planimetría microscópica digital computarizado Image-Pro Plus sobre secciones seriales, (5 mm aparte) las arterias carótidas teñidas por el tinte Van Gieson. Todos los datos fueron expresados como media $\pm$ SD. El análisis estadístico fue realizado con el uso de software SPSS. Las variables continuas fueron comparadas utilizando pruebas t no pareadas. Un valor de $P \leq 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Como se observa en las Figs. 13A y 13B, el tratamiento TTP-4000 significativamente redujo la proporción íntima/media y la proliferación de células de músculo liso vasculares en una forma sensible a dosis. En la Fig. 13 B, el eje y representa el número de células de proliferación BrdU.

B. TTP4000 en un modelo animal de AD

Se realizaron experimentos para evaluar si TTP-4000 podría afectar la formación amiloide y disfunción cognitiva en un modelo murino de AD. Los experimentos utilizaron ratones transgénicos expresando la proteína precursora amiloide (APP) mutante Swedish humana bajo el control del promotor de cadena PDGF-B. Con el tiempo, estos ratones generaron altos niveles del ligando RAGE, beta amiloide ($A\beta$). Anteriormente, se ha mostrado que el tratamiento sRAGE durante tres meses reduce tanto la formación de placas amiloides en el cerebro como el aumento asociado en marcadores inflamatorios en este modelo.

Los ratones APP (machos) utilizados en este experimento fueron diseñados mediante microinyección del gen APP humano (con las mutaciones Swedish y London) en óvulos de ratón bajo el control de promotor de gen de cadena de factor B de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B). Los ratones fueron generados sobre un fondo C57BL/6 y fueron desarrollados por Molecular Therapeutics Inc. Los animales fueron alimentados a voluntad y mantenidos por apareamiento hermano hermana. Los ratones generados a partir de este constructo desarrollaron depósitos amiloides comenzando a los 6 meses de edad. Los animales fueron madurados durante 6 meses y luego mantenidos durante 90 días y sacrificados para cuantificación amiloide.

A ratones transgénicos APP se administró vehículo o TTP4000 cada tercer día [qod(i.p.)] durante 90 días comenzando a los 6 meses de edad. Al final del experimento, los animales fueron sacrificados y examinados para carga de placa A β en el cerebro (es decir, número de placas). Un grupo APP de control de seis meses se utilizó para determinar la línea base de depósitos amiloides. Además, al final del estudio, los animales fueron sometidos a análisis de conducta (Morris water maze). Los investigadores no tuvieron conocimiento de los compuestos de estudio. Las muestras fueron dadas a los ratones a 0.25 ml/ratón/cada tercer día. Además, a un grupo de ratones se dio 200 ug/día de sRAGE humano.

10 **1. Deposición Beta Amiloide**

Para examen histológico, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal (IP) de pentobarbital de sodio (50 mg/kg). Los animales fueron sometidos a perfusión transcardial con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) a 4°C seguido por paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron retirados y colocados en paraformaldehído al 4% durante la noche. Los cerebros fueron procesados a parafina y fijados. Se obtuvieron 10 secciones seriales de 30- μ m de espesor a través del cerebro. Las secciones fueron sometidas a anticuerpo primario durante la noche a 4°C (anticuerpo péptido A β) para detectar los depósitos amiloides en el cerebro de animales transgénicos (Guo, *J. Neurosci.*, 22:5900-5909 (2002)). Las secciones fueron lavadas en solución salina Tris-amortiguada (TBS) y anticuerpo secundario fue agregado e incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, las secciones fueron incubadas como se explicó en el kit Vector ABC Elite (Vector Laboratories) y teñidas con ácido diaminobenzóico (DAB). Las reacciones fueron detenidas en agua y cubiertas después de tratamiento con xileno. El área amiloide en cada sección fue determinada con un sistema de análisis de imágenes asistido por computador, consistiendo en un computador Power Macintosh equipado con una cámara Hitachi CCD de tarjeta de captura de cuadros Quick Capture montada sobre un microscopio Olimpos y trípode para cámara. Se utilizó Software de Análisis de Imágenes NIH, v. 1.55. Las imágenes fueron capturadas y el área total de amiloide se determinó sobre las 10 secciones. Un único operador sin conocimiento del estado del tratamiento realizó todas las mediciones. La suma de los volúmenes amiloides y la división por el número total de secciones fue hecha para calcular el volumen amiloide.

Para análisis cuantitativo, se utilizó un ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) para medir los niveles de A β total humano, A β_{total} y A β_{1-42} en los cerebros de

BB
BB

ratones transgénicos APP (Biosource Internacional, Camarillo, CA). $A\beta_{total}$ y $A\beta_{1-42}$ fueron extraídos de cerebros de ratón mediante hidrocloreto de guanidina y cuantificados como lo describió el fabricante. Este ensayo extrae el péptido $A\beta$ total del cerebro (tanto soluble como agregado).

5

2. Función Cognitiva

La prueba de Morris de laberinto de agua fue realizada como sigue: Todos los ratones fueron probados una vez en la prueba de Morris de laberinto de agua al final del experimento. Los ratones fueron entrenados en un laberinto de agua de campo abierto de 1.2 m. La piscina se llenó hasta una profundidad de 30 cm con agua y mantenido a 25°C. La plataforma guiada (10 cm cuadrados) fue colocada 1 cm por debajo de la superficie del agua. Durante los ensayos, la plataforma fue retirada de la piscina. La prueba trenzada fue realizada en la piscina rodeada con cortinas blancas para ocultar cualquier pista de laberinto extra. Todos los animales fueron sometidos a preentrenamiento no-espacial (NSO) durante tres días consecutivos. Estos ensayos son para preparar los animales para la prueba final para determinar la retención de memoria para encontrar la plataforma. Estos ensayos no fueron registrados, pero fueron solamente para propósitos de entrenamiento. Para los estudios de entrenamiento y aprendizaje, las cortinas fueron retiradas para pistas de laberinto extra (esto permitió identificación de animales con deterioros de natación). El día 1, los ratones fueron colocados sobre la plataforma escondida durante 20 segundos (ensayo 1), para los ensayos 2-3 los animales fueron liberados en el agua a una distancia de 10 cm de la plataforma –cued o plataforma escondida (ensayo 4) y dejados nadar hacia la plataforma. En el segundo día de ensayos, la plataforma escondida fue movida aleatoriamente entre el centro de la piscina o el centro de cada cuadrante. Los animales fueron liberados en la piscina, aleatoriamente enfrentado la pared y se dejaron 60 segundos para alcanzar la plataforma (3 ensayos). En el tercer ensayo, a los animales se les dio tres ensayos, dos con una plataforma escondida y uno con una plataforma cued. Dos días después de NSP, los animales fueron sometidos a ensayos de conducta final (pruebas de laberinto de agua Morris). Para estos ensayos (3 por animal), la plataforma se colocó en el centro de un cuadrante de la piscina y los animales fueron liberados enfrentando la pared en una forma aleatoria. El animal se dejó encontrar la plataforma o nadar durante 60 segundos (periodo de latencia, tiempo que toma para encontrar la plataforma). Todos los animales fueron probados dentro de 4-6 horas de dosificación y fueron aleatoriamente seleccionados para prueba por parte de un operador sin conocimiento del grupo de prueba.

30

234
237

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ desviaciones estándares (SD). El significado de las diferencias en los estudios amiloides y de conducta se analizó utilizando una prueba *t*. Se hicieron comparaciones entre el grupo de control APP de seis meses de edad y los animales TTP-4000 tratados, así como también el grupo tratado de vehículo APP de nueve meses y los animales tratados con TTP-4000. El porcentaje de cambios en amiloide y conducta se determinó tomando la suma de los datos en cada grupo y dividiendo por la comparación (es decir, 1, i.p./control de 6 meses = porcentaje de cambio).

Las Figs. 14A y 14B muestran que los ratones tratados durante 3 meses con TTP-4000 o sRAGE de ratón tuvieron menos placas A β y menos disfunción cognitiva que los animales tratados con vehículo y IgG1 humana de control negativo (IgG1). Estos datos indican que TTP-4000 es efectivo para reducir patología AD en un modelo de ratón transgénico. También se encontró que al igual que sRAGE, TTP-4000 puede reducir las citoquinas inflamatorias IL-1 y TNF- β (no se muestran datos).

C. Eficacia de TTP-4000 en un modelo animal de apoplejía

TTP-4000 también se comparó con sRAGE en un modelo animal relevante de enfermedad de apoplejía. En este modelo, la arteria carótida media de un ratón fue ligada durante 1 hora seguido por 23 horas de repercusión en cuyo punto los ratones fueron sacrificados y el área de infarto en el cerebro fue evaluada. Los ratones fueron tratados con sRAGE o TTP-4000 o inmunoglobulina de control justo antes de la repercusión.

En estos experimentos, machos C57BL/6 fueron inyectados con vehículo a 250 μ l/ratón o artículos de prueba TTP (TTP-3000, TTP-4000 a 250 μ l/ratón). Los ratones fueron inyectados de manera intraperitoneal, 1 hora después de la iniciación de isquemia. Los ratones fueron sometidos a una hora de isquemia cerebral seguido por 24 horas de repercusión. Para inducir isquemia, cada ratón fue anestesiado y la temperatura del cuerpo fue mantenida a -37°C mediante calentamiento externo. La arteria carótida común izquierda (CCA) fue expuesta a través de una incisión media en el cuello. Un gancho microquirúrgico se colocó alrededor del origen de la arteria carótida interna (ICA). El extremo distal de ECA fue ligado con seda y se cortó de manera transversal. Una seda 6-0 fue atada de manera suelta alrededor del muñón ECA. Una punta quemada de una sutura de nailon fue suavemente insertada en el muñón ECA. El bucle de la seda 6-0 fue apretado alrededor del muñón y la sutura de nailon fue avanzada hacia y a través de la arteria carótida interna (ICA), hasta que ésta descansó en la arteria cerebral anterior, ocluyendo así la comunicación anterior y las arterias cerebrales

255
234

medias. Después de haber colocado la sutura de nailón durante 1 hora, el animal fue re-anestesiado, la temperatura rectal fue registrada y la sutura fue retirada y la incisión se cerró.

El volumen de infarto se determinó al anestesiarse los animales con una inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio (50 mg/kg) y luego retirando los cerebros. Luego los cerebros fueron seccionados en cuatro secciones de 2-mm a través de la región infartada y colocados en cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) durante 30 minutos. Luego, las secciones fueron colocadas en paraformaldehído al 4% durante la noche. El área de infarto en cada sección se determinó con un sistema de análisis de imágenes asistido por computador, consistiendo en un computador Power Macintosh equipado con una cámara Hitachi CCD de tarjeta de captura de cuadros Quick Capture montada sobre un trípode para cámara. Se utilizó el software de Análisis de Imágenes NIH, v. 1.55. Las imágenes se capturaron y el área de infarto se determinó sobre las secciones. Un único operador sin conocimiento del estado de tratamiento realizó todas las mediciones. Sumando los volúmenes de infarto de las secciones se calculó el volumen de infarto total. Los resultados son expresados como la media $\pm$ desviación estándar (SD). El significado de la diferencia en los datos de volumen de infarto se analizó utilizando una prueba *t*.

Como se ilustró en los datos en la Tabla 2, TTP-4000 fue más eficaz que sRAGE para limitar el área de infarto en estos animales indicando que TTP-4000, debido a su vida media mejor en plasma, pudo mantener mayor protección en estos animales.

Ejemplo 6: Detección de la Proteína de Fusión RAGE por ELISA

Inicialmente, 50 μ L del anticuerpo monoclonal específico RAGE 1HB1011 a una concentración de 10 μ g/mL en 1XPBS pH 7.3 es esparcido sobre placas a través de incubación durante la noche. Cuando están listas para utilizar, las placas son lavadas tres veces con 300 μ L de buffer de lavado 1X Imidazol Tween y bloqueadas con BSA al 1%. Las muestras (diluidas) y diluciones estándares de diluciones TTP-4000 conocidas son agregadas a 100 μ L de volumen final. Las muestras son dejadas incubarse a temperatura ambiente durante una hora. Después de incubación, las placas son lavadas tres veces. Se agrega un conjugado AP IgG1 anti-humano de cabra (Sigma A3312) en 1XPBS con BSA al 1% y se deja incubarse a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas son lavadas tres veces. El color fue elucidado con paranitrofenilfosfato.

Ejemplo 7: Cuantificación de Unión de Ligandos RAGE a Proteína de Fusión RAGE

230
205

La Figura 15 muestra curvas de saturación-unión con TTP-4000 a varios ligandos RAGE conocidos inmovilizados. Los ligandos son inmovilizados sobre una placa de microtítulos e incubados en la presencia de concentraciones crecientes de proteína de fusión entre 0 y 360 nM. La interacción proteína de fusión-ligando es detectada utilizando un anticuerpo policlonal conjugado con fosfatasa alcalina que es específica para la porción IgG de la quimera de fusión. Kds relativos fueron calculados utilizando software GRaphpad Prizm y corresponden con valores de literatura establecidos de valores de ligandos RAGE-RAGE. HMG1B = Anfoterita, CML= Lisina de Carboximetilo, Un beta = Beta Amiloide 1-40.

Lo anterior se considera como ilustrativo solamente de lo principal de invento. Puesto que numerosas modificaciones y cambios fácilmente ocurrirán a aquellos con experiencia en el estado de la técnica, no se pretende limitar el invento a las reivindicaciones exactas mostradas y descritas, y todas las modificaciones apropiadas y equivalentes que caen dentro del alcance de las reivindicaciones anexas se consideran dentro del concepto inventivo actual.

237
238

REIVINDICACIONES:

1. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido RAGE unido a un segundo polipéptido no RAGE en donde el polipéptido RAGE comprende un sitio de unión de ligando RAGE.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el polipéptido RAGE está unido a un polipéptido el cual comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción de un dominio de inmunoglobulina.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 2, en donde el polipéptido comprende un dominio de inmunoglobulina que comprende por lo menos una porción de por lo menos uno de los dominios C_H2 ó C_H3 de un IgG humano.
4. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el sitio de unión de ligando RAGE comprende la SEQ ID MO: 9 o una secuencia 90% idéntica a ella, o la SEQ ID NO: 10 o una secuencia 90% idéntica a ella.
5. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el polipéptido RAGE comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 que corresponden a los aminoácidos 24-116 del RAGE humano.
6. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el polipéptido RAGE comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 que corresponden a los aminoácidos 24-123 del RAGE humano.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el polipéptido RAGE comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 que corresponden a los aminoácidos 24-226 del RAGE humano.
8. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el polipéptido RAGE comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 que corresponden a los aminoácidos 24-339 del RAGE humano o sRAGE.
9. Una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido RAGE unido a un segundo polipéptido no RAGE en donde el polipéptido RAGE comprende un sitio de unión de ligando RAGE.
10. La secuencia aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde el polipéptido RAGE está unido a un polipéptido el cual comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción de un dominio de inmunoglobulina.
11. La secuencia aislada de ácido nucleico de la reivindicación 10, en donde el polipéptido comprende un dominio de inmunoglobulina que comprende por lo menos una porción de por lo menos uno de los dominios C_H2 ó C_H3 de un IgG humano.
12. La secuencia aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde el sitio de unión de ligando RAGE comprende la SEQ ID MO: 9 o una secuencia 90% idéntica a ella, o la SEQ ID NO: 10 o una secuencia 90% idéntica a ella.

13. La secuencia aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, la cual comprende la SEQ ID NO: 25 o un fragmento de la misma.
14. La secuencia aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, la cual comprende la SEQ ID NO: 26 o un fragmento de la misma.
15. La secuencia aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, la cual comprende la SEQ ID NO: 28 o un fragmento de la misma.
16. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión RAGE en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la proteína de fusión RAGE comprende un polipéptido RAGE unido a un segundo polipéptido no RAGE en donde el polipéptido RAGE comprende un sitio de unión de ligando RAGE.
17. La composición de la reivindicación 16, en donde el polipéptido RAGE está unido a un polipéptido el cual comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción de un dominio de inmunoglobulina.
18. La composición de la reivindicación 17, en donde el polipéptido comprende un dominio de inmunoglobulina que comprende por lo menos una porción de por lo menos uno de los dominios C_H2 ó C_H3 de un IgG humano.
19. La composición de la reivindicación 16, en donde el sitio de unión de ligando RAGE comprende la SEQ ID NO: 9 o una secuencia 90% idéntica a ella, o la SEQ ID NO: 10 o una secuencia 90% idéntica a ella.
20. La composición de la reivindicación 16, en donde el polipéptido RAGE comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 que corresponden a los aminoácidos 24-116 del RAGE humano.
21. La composición de la reivindicación 16, en donde la proteína de fusión RAGE está formulada como una solución inyectable.
22. La composición de la reivindicación 16, en donde la proteína de fusión RAGE está formulada como un polvo liofilizado estéril.
23. Un método para fabricar una proteína de fusión RAGE el cual comprende el paso de unir de manera covalente un polipéptido RAGE unido a un segundo polipéptido no RAGE en donde el polipéptido RAGE comprende un sitio de unión de ligando RAGE.
24. El método de la reivindicación 23, en donde el polipéptido RAGE unido y el segundo polipéptido no RAGE están codificados por un constructo recombinante de ADN.
25. El método de la reivindicación 24, que además comprende el paso de incorporar el constructo de ADN en un vector de expresión.

239
JB

26. El método de la reivindicación 24, que además comprende insertar el vector de expresión en una célula huésped.
27. Un método para la detección de moduladores RAGE el cual comprende: (a) proporcionar una proteína RAGE que comprende un polipéptido RAGE que comprenda un sitio de unión de ligando RAGE unido a un segundo polipéptido no RAGE; (b) mezclar un compuesto de interés y un ligando que tenga una afinidad de unión conocida para con RAGE con la proteína de fusión; y (c) medir la unión del ligando RAGE conocido con la proteína de fusión RAGE en la presencia del compuesto de interés.
28. Un kit para la detección de moduladores RAGE el cual comprende: (a) un compuesto que una afinidad de unión conocida con RAGE como control positivo; (b) una proteína de fusión RAGE que comprende un polipéptido RAGE que comprenda un sitio de unión de ligando RAGE unido a un segundo polipéptido no RAGE; y (c) instrucciones para su uso.
29. Un método para tratar un trastorno mediado por RAGE en un sujeto el cual comprende administrar a dicho sujeto un polipéptido que comprende un polipéptido RAGE que comprenda un sitio de unión de ligando RAGE unido a un segundo polipéptido no RAGE.
30. El método de la reivindicación 29, en donde el polipéptido RAGE está unido a un polipéptido el cual comprende un dominio de inmunoglobulina o una porción de un dominio de inmunoglobulina.
31. El método de la reivindicación 30, en donde el polipéptido comprende un dominio de inmunoglobulina que comprende por lo menos una porción de por lo menos uno de los dominios C_H2 ó C_H3 de un IgG humano.
32. El método de la reivindicación 29, en donde el sitio de unión de ligando RAGE comprende la SEQ ID MO: 9 o una secuencia 90% idéntica a ella, o la SEQ ID NO: 10 o una secuencia 90% idéntica a ella.
33. El método de la reivindicación 29, en donde el polipéptido RAGE comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 que corresponden a los aminoácidos 24-116 del RAGE humano.
34. El método de la reivindicación 29, el cual comprende la administración intravenosa de la proteína de fusión RAGE al sujeto.
35. El método de la reivindicación 29, en donde el cual comprende la administración intraperitonea de la proteína de fusión RAGE al sujeto.
36. El método de la reivindicación 29, en donde el cual comprende la administración subcutánea de la proteína de fusión RAGE al sujeto.
37. El método de la reivindicación 29, en donde la proteína de fusión es usada para tratar un síntoma de diabetes o un síntoma de complicaciones tardías por diabetes.

240
259

38. El método de la reivindicación 37, en donde el síntoma de diabetes o por complicaciones tardías por diabetes comprende neuropatía diabética.

39. El método de la reivindicación 37 en donde el síntoma de diabetes o por complicaciones tardías por diabetes comprende retinopatía diabética.

245
241**FIG. 1A****HUMAN RAGE (SEO ID NO: 1)**

MAAGTAVGAW VLVLSIWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALALGILGG
LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
TGGP

HUMAN RAGE WITHOUT SIGNAL SEQUENCE (SEO ID NO: 2)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALALGILGG
LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
TGGP

FIG. 1B**HUMAN RAGE WITHOUT SIGNAL SEQUENCE (SEO ID NO: 3)**

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALALGILGG
LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
TGGP

JAZ
24

2/26

FIG. 1C

HUMAN sRAGE - (SEQ ID NO:4)

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

HUMAN sRAGE WITHOUT SIGNAL SEQUENCE (SEQ ID NO: 5)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

HUMAN sRAGE WITHOUT SIGNAL SEQUENCE (SEQ ID NO: 6)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

3/26

FIG. 1D**HUMAN RAGE V-DOMAIN (SEO ID NO: 7)**

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

HUMAN RAGE V-DOMAIN (SEO ID NO: 8)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

V-DOMAIN FRAGMENT OF HUMAN RAGE (SEO ID NO: 9)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

V-DOMAIN FRAGMENT OF HUMAN RAGE (SEO ID NO: 10)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 124-221 (SEO ID NO: 11)

PEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLOS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL R

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 227-317 (SEO ID NO: 12)

PRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTILTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVS

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 23-123 (SEO ID NO: 13)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGK

244
243

4/26

FIG. 1 E

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 24-123 (SEQ ID NO: 14)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGK

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 23-136 (SEQ ID NO: 15)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 24-136 (SEQ ID NO: 16)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 23-226 (SEQ ID NO: 17)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQ

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 24-226 (SEQ ID NO: 18)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQ

5/26

245

FIG. 1F**HUMAN RAGE AMINO ACIDS 23-251 (SEQ ID NO: 19)**

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSIFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

HUMAN RAGE AMINO ACIDS 24-251 (SEQ ID NO: 20)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSIFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

RAGE LINKER (SEQ ID NO: 21)

VYQIPGK

RAGE LINKER (SEQ ID NO: 22)

TAPIQPRVWE PVPLEEVQLV VEPEGGAVAP

RAGE LINKER (SEQ ID NO: 23)

VYQIPGKPEI VDSASELTAG

RAGE LINKER (SEQ ID NO: 24)

TAPIQ

245
246**FIG. 1G****DNA ENCODING HUMAN RAGE 1-118 (SEQ ID NO: 25)**

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCCCTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTAC

DNA ENCODING HUMAN RAGE 1-123 (SEQ ID NO: 26)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCCCTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAG

DNA ENCODING HUMAN RAGE 1-136 (SEQ ID NO: 27)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCCCTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGT

24B
247**FIG. 1H****DNA ENCODING HUMAN RAGE 1-230 (SEQ ID NO:28)**

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAGCTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCCAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCCAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG

DNA ENCODING HUMAN RAGE 1-251 (SEQ ID NO:29)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAGCTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCCAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCCAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG AGCAGTAGCT
CCT

8/26

FIG. 11**PARTIAL HUMAN C_H2 AND C_H3 DOMAINS (SEQ ID NO: 38)**

PSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP
IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
LHNHYTQKSL SLSPGK

DNA ENCODING PARTIAL HUMAN C_H2 AND C_H3 DOMAINS (SEQ ID NO: 39)

CCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCTCGA GAAAACCATC
TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

HUMAN C_H2 AND C_H3 DOMAINS (SEQ ID NO: 40)

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

9/26

249
248**FIG. 1J****DNA ENCODING HUMAN C_H2 AND C_H3 DOMAINS (SEQ ID NO: 41)**

CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC AAGACCAC
GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA
CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
TCCGGGTAAA TGA

HUMAN C_H2 DOMAIN (SEQ ID NO: 42)

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
LPAPIEKTIS KAK

HUMAN C_H3 DOMAIN (SEQ ID NO: 43)

GQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

RAGE LINKER (SEQ ID NO: 44)

ISI IEPGEEGPTA GSVGGSGGLT LA

10/26

250
247

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACCTCA
CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGGAAGCCCC TGGTGCCATA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCACAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCACAGGC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
CCTCCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT
CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

DNA sequence of RAGE-Fc (TTP-4000) coding region (SEQ ID NO: 30)

FIG. 2

B1
260

11/26

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTGCGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTCC GTCAGTCTTC CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC
ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA
CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC
ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA
GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA
CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG
CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG A

DNA sequence of RAGE-Fc (TTP-3000) coding region (SEQ ID NO: 31).

FIG. 3

25
25

12/26

SEQ ID NO: 32

MAAGTAVGAW ALVLSLWGAV VQAQNTIARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLH
 WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG PWDVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIKRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWELD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRERAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI
 SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ
 PENNYKTPPP VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY
 TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 33

AQNTIARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLH WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG
 PWDVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIKRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWELD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRERAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSGGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 34

QNTIARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLH WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG
 PWDVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIKRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWELD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRERAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSGGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

Alternate sequences encoding a four domain RAGE-Fc IgG fusion protein

FIG. 4

253
252

13/26

SEQ ID NO: 35

MAAGTAVGAW VLVLSTLWGAV VQAQNTARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSIFLPAVG IQDEGIYRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSINKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD
GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 36

AQNTARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSIFLPAVG IQDEGIYRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
KVSINKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 37

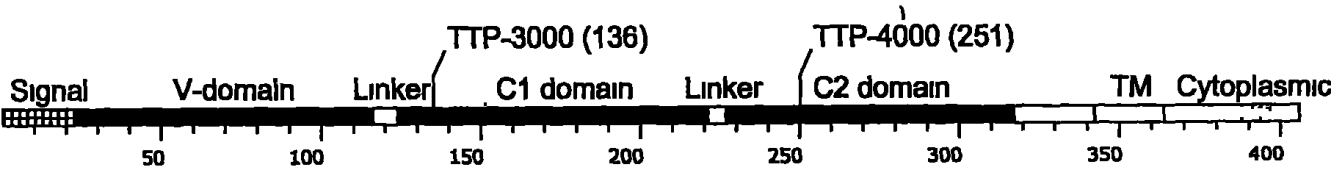
QNTARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSIFLPAVG IQDEGIYRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
KVSINKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

Alternate sequences encoding a three domain RAGE-Fc IgG fusion protein

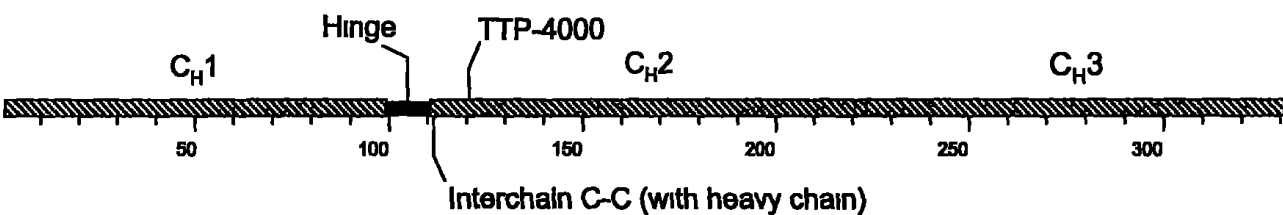
FIG. 5

FIG. 6A

hRAGE Domain Structure



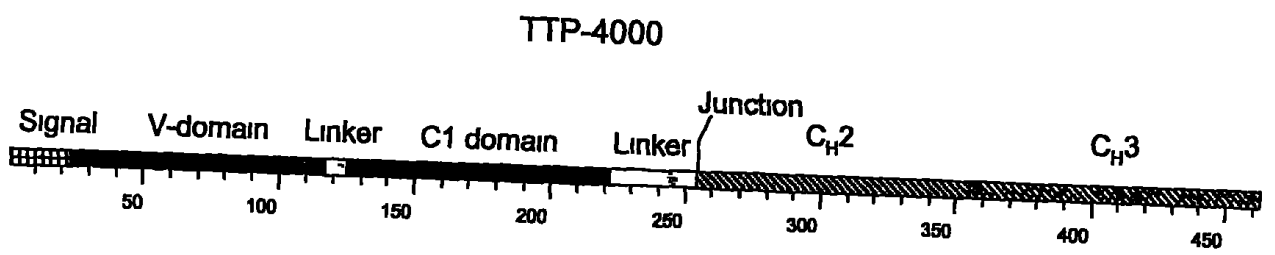
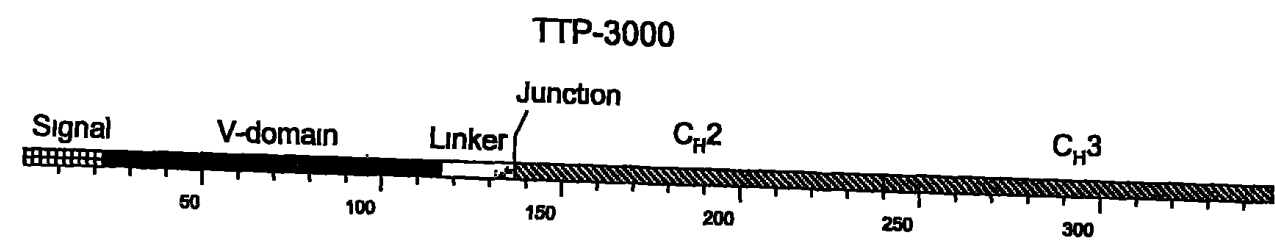
HUMAN Ig gamma-1 Fc



Handwritten signature or initials.

25

FIG. 6B



25

256

256

FIG. 7

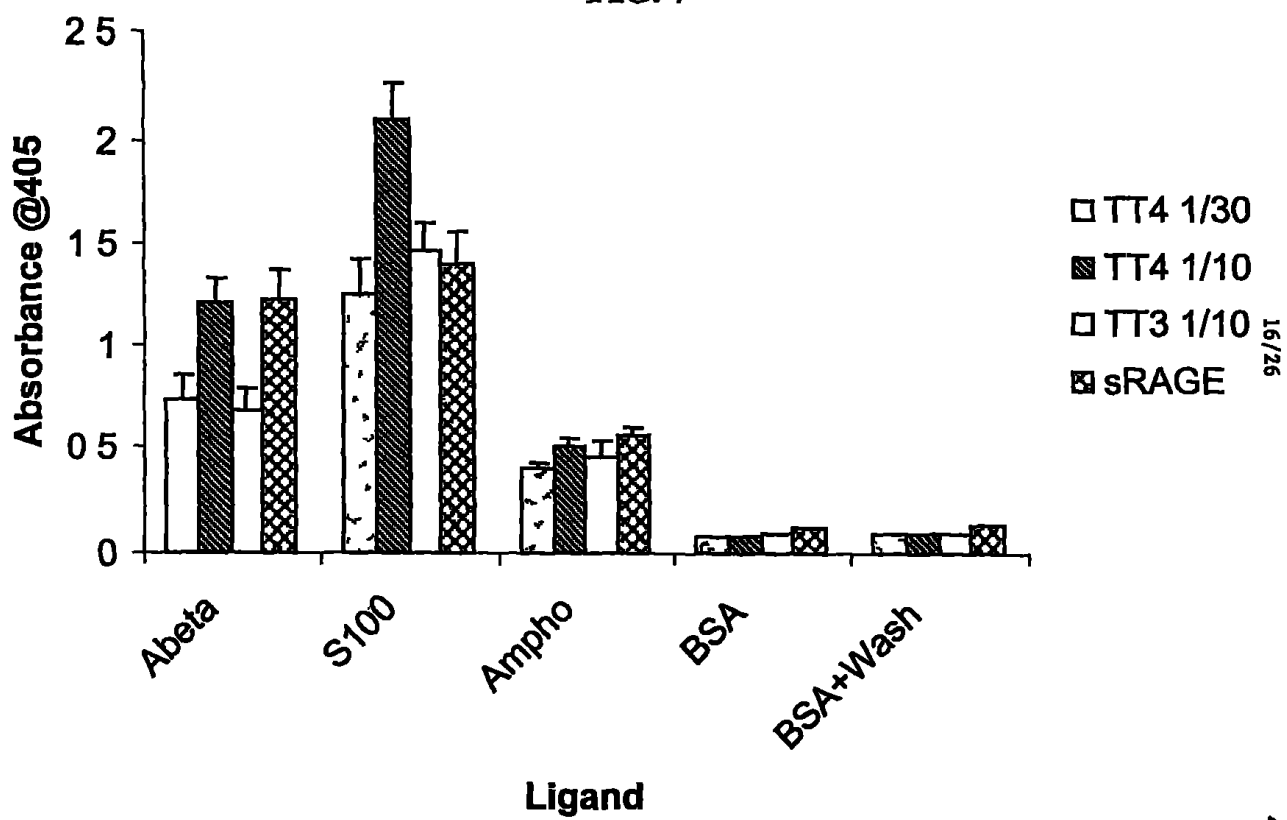
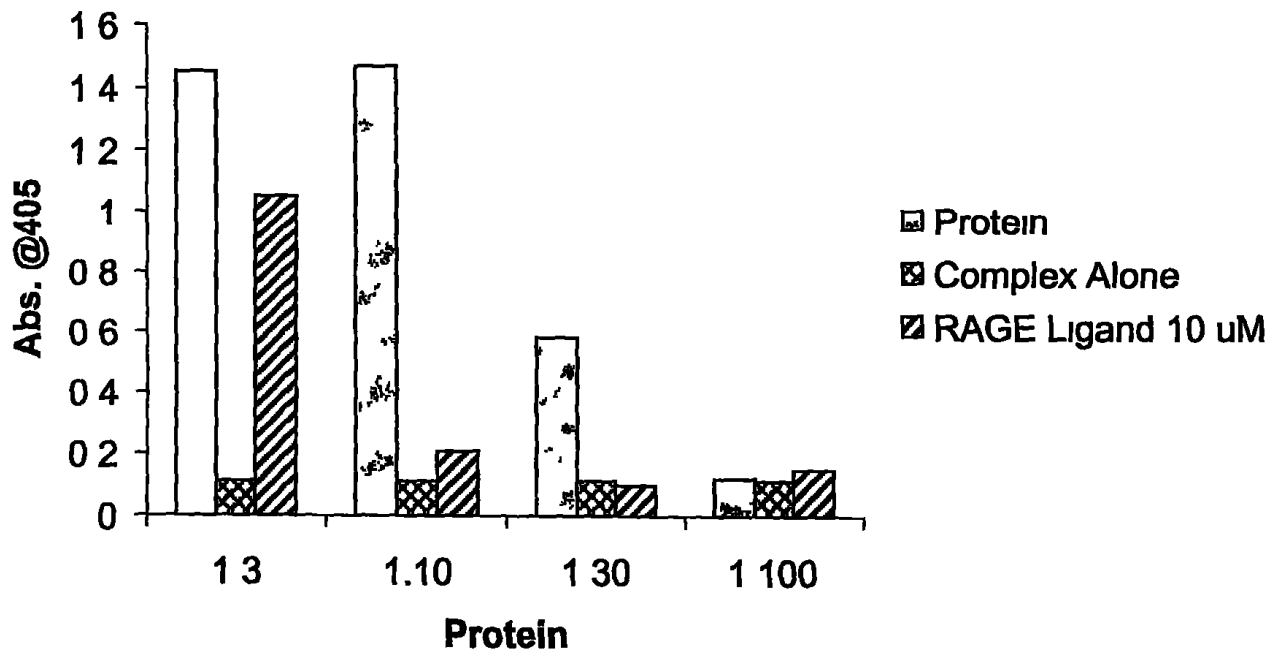


FIG. 8



17/26

[Handwritten signature]

252

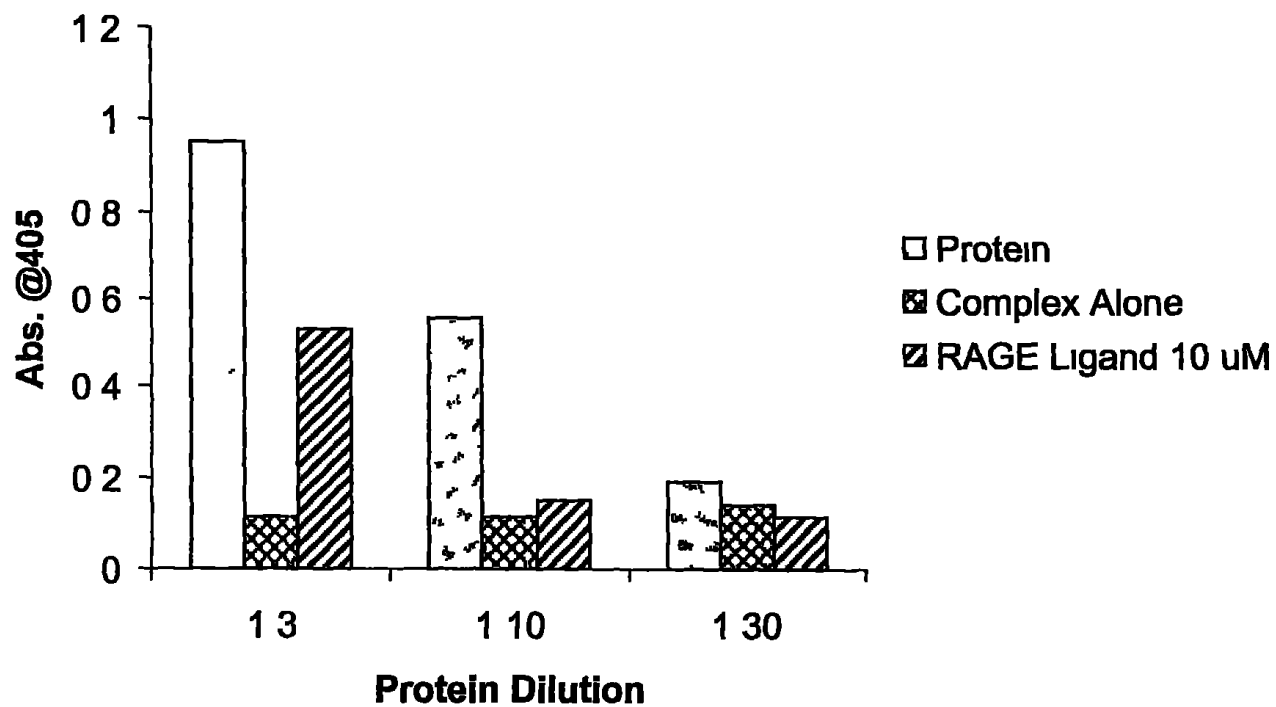
W/O 2006/017643

PCT/US2005/027694

18/26

252

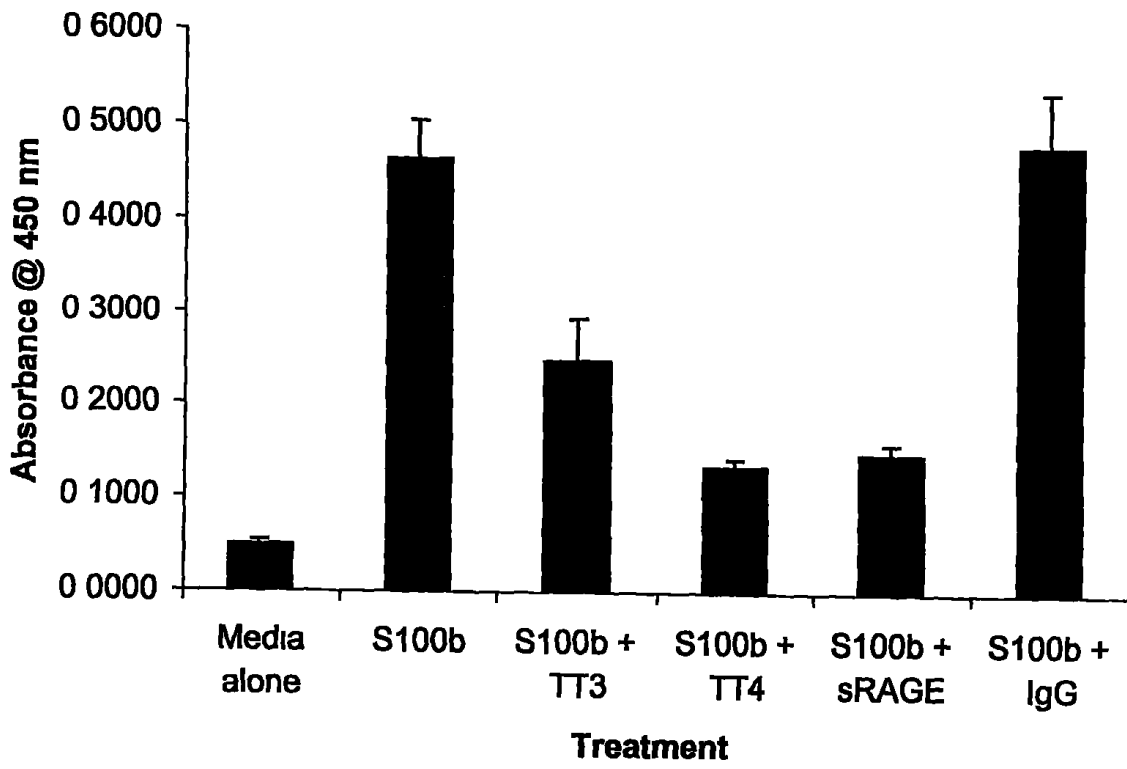
FIG. 9



19/26

Handwritten signature

FIG. 10



092

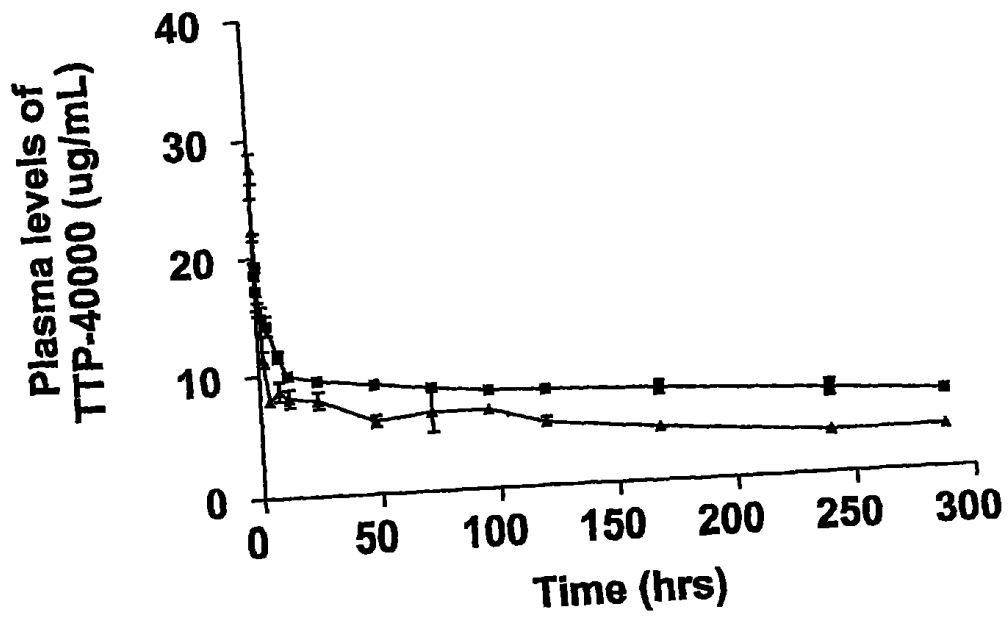
WO 2006/017643

PCT/US2005/021694

20/26

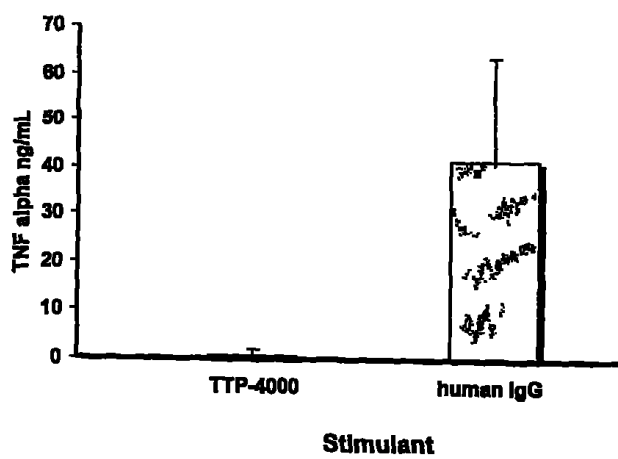
29

FIG. 11



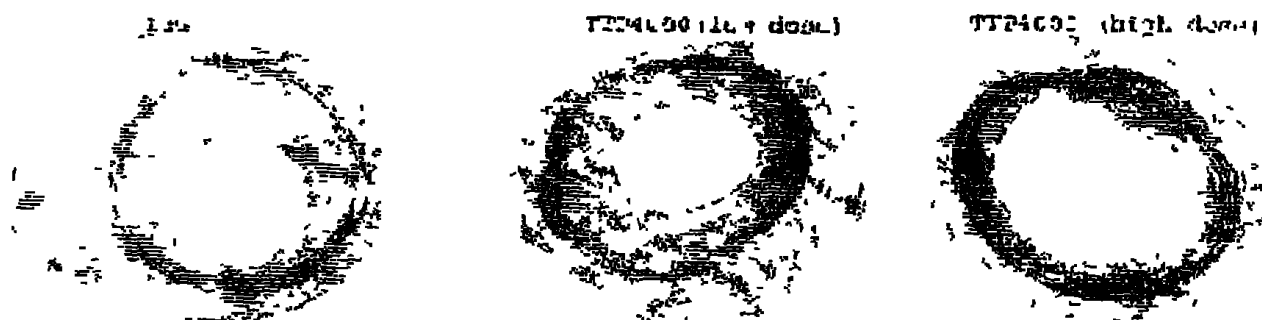
26

FIG. 12



22/26

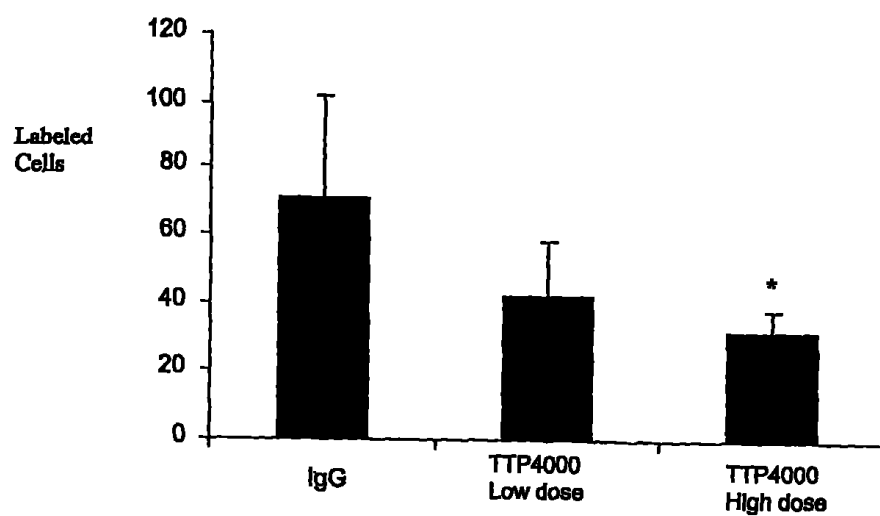
FIG. 13A



23/26

262

FIG. 13B

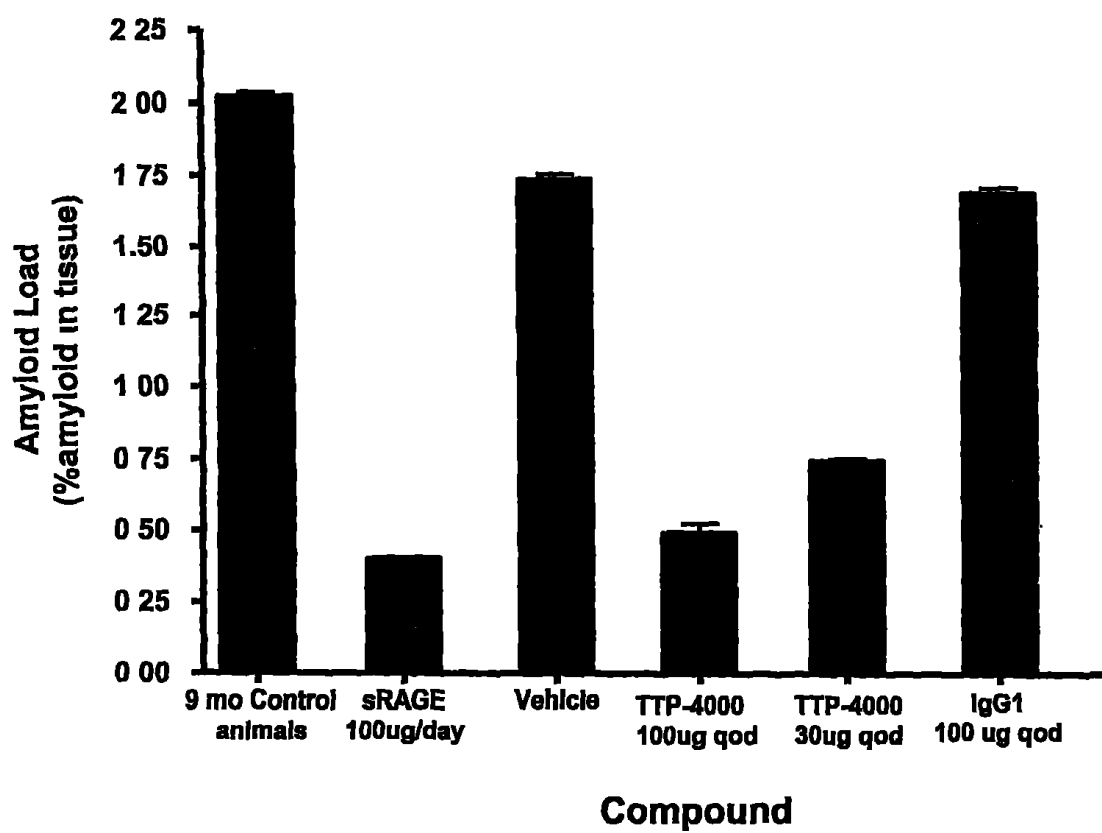


792

24/26

263

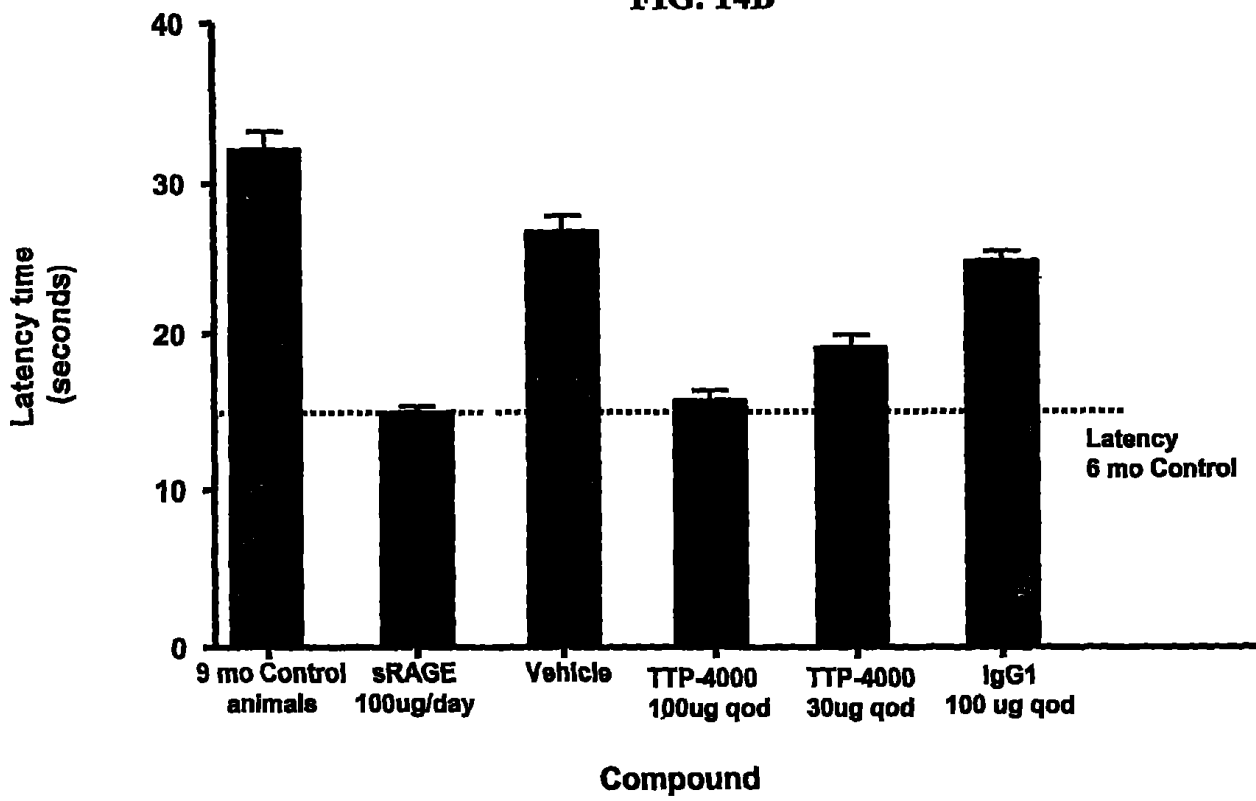
FIG. 14A



25/26

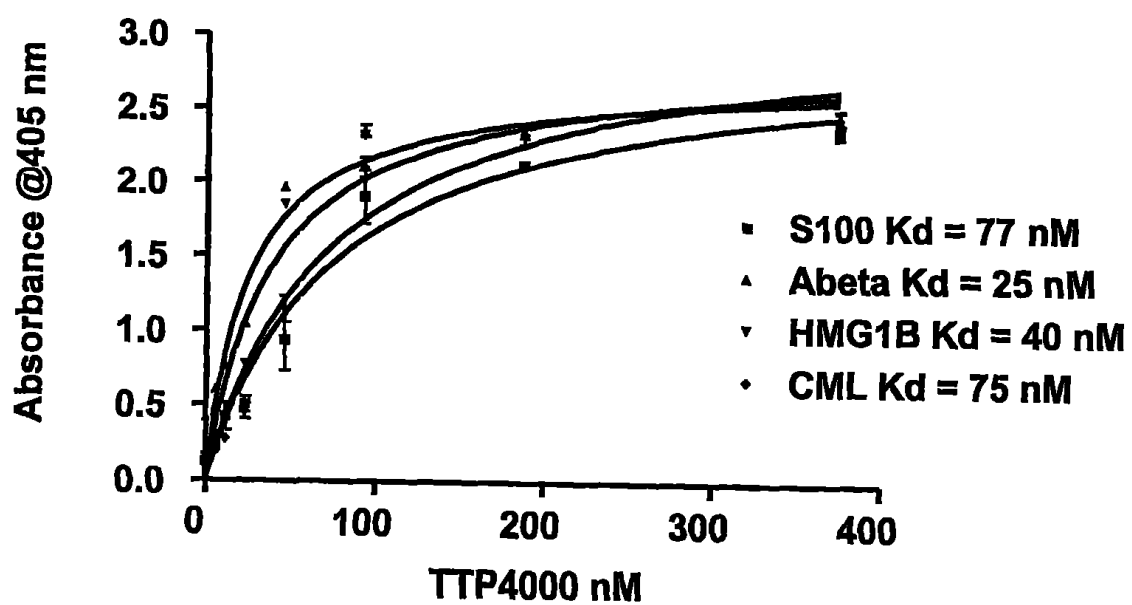
264

FIG. 14B



266

FIG. 15



267
266

1

SEQUENCE LISTING

<110> TransTech Pharma, Inc.

<120> RAGE Fusion Proteins and Methods of Use

<130> 41305-318282

<150> US 60/598,362

<151> 2004-08-03

<160> 44

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 404

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp

268
268

2

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

269
268

3

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
325 330 335

Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly
340 345 350

Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg
355 360 365

Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu
370 375 380

Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser
385 390 395 400

Thr Gly Gly Pro

<210> 2
<211> 382
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

270

4

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro
225 230 235 240

Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu
245 250 255

Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln
260 265 270

Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro
275 280 285

271

5

Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu
290 295 300

Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
305 310 315 320

Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Ile
325 330 335

Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys
340 345 350

Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln
355 360 365

Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
370 375 380

<210> 3
<211> 381
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

272

6

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala
225 230 235 240

Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro
245 250 255

Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp
260 265 270

Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln
275 280 285

273

7

Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly
290 295 300

Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu
305 310 315 320

Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly
325 330 335

Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala
340 345 350

Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser
355 360 365

Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
370 375 380

<210> 4
<211> 339
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

274
274

8

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
130 135 140

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
145 150 155 160

Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
165 170 175

Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
180 185 190

Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
210 215 220

Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
245 250 255

Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
260 265 270

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu

275
275

9

275

280

285

Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
290 295 300

His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
305 310 315 320

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
325 330 335

Gly Leu Gly

<210> 5
<211> 317
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

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

276

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

278

Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly
305 310 315

<210> 6
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

278

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
 165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
 180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
 195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
 210 215 220

Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala
 225 230 235 240

Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro
 245 250 255

Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp
 260 265 270

Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln
 275 280 285

Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly
 290 295 300

Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly
 305 310 315

<210> 7
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

13

229

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg
85 90

<210> 8
<211> 93
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg
85 90

280

14

<210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys
 20 25 30

<210> 10
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys
 20 25

<210> 11
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn
 1 5 10 15

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

Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val
 35 40 45

Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr
 50 55 60

201

15

Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg
65 70 75 80

Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala
85 90 95

Leu Arg

<210> 12
<211> 91
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val
1 5 10 15

Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
20 25 30

Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp
35 40 45

Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu
50 55 60

Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser
65 70 75 80

Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser
85 90

<210> 13
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

202

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys
100

<210> 14
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

283

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys
100

<210> 15
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly

284

18

<210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly

<210> 17
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

285
282

19

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
195 200

<210> 18
<211> 203
<212> PRT

296

20

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Asn Ile Thr Ala Arg, Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
 115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
 130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
 145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
 165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
 180 185 190

287

21

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
195 200

<210> 19
<211> 229
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

200

22

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro
225

<210> 20
<211> 228
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

289

23

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
 115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
 130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
 145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
 165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
 180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
 195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
 210 215 220

Ala Val Ala Pro
 225

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys
 1 5

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT

290

24

<213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu
1 5 10 15

Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro
20 25 30

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu
1 5 10 15

Leu Thr Ala Gly
20

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Thr Ala Pro Ile Gln
1 5

<210> 25

<211> 354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60

gtaggtgctc aaaacatcac agcccggtt ggcgagccac tgggtgctga gtgtaagggt 120

gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180

tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggg ccctgggaca gtgtggctcg tgccttccc 240

291

25

aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300

gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc ggtccgtgt ctac 354

<210> 26

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg ggggycagta 60

gtagggtgtc aaaacatcac agcccggtatt ggcgagccac tgggtgctgaa gtgtaagggg 120

gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180

tggaaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240

aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300

gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc ggtccgtgt ctaccagatt 360

cctgggaag 369

<210> 27

<211> 408

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg ggggycagta 60

gtagggtgtc aaaacatcac agcccggtatt ggcgagccac tgggtgctgaa gtgtaagggg 120

gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180

tggaaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240

aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300

gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc ggtccgtgt ctaccagatt 360

cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cygctggt 408

<210> 28

<211> 690

<212> DNA

292
2A1

26

<213> Homo sapiens

<400> 28

```

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta   60
gtagggtgtc aaaacatcac agcccggtatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg   120
gcccccaaga aaccacccca ggggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct   180
tggaaaggtec tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgccttccc   240
aacggctccc tcttcttccc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag   300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt   360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgac tctgaactca cggctggtgt tcccaataag   420
gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat   480
gggaagcccc tggtgcccaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac   540
cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgacccagc ccggggaggga   600
gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttccccgaca ccgggccttg   660
cgcacagccc ccattccagc cagtgtctgg                                     690

```

<210> 29

<211> 753

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

```

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta   60
gtagggtgtc aaaacatcac agcccggtatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg   120
gcccccaaga aaccacccca ggggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct   180
tggaaaggtec tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgccttccc   240
aacggctccc tcttcttccc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag   300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt   360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgac tctgaactca cggctggtgt tcccaataag   420
gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat   480
gggaagcccc tggtgcccaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac   540

```

293
292

27

cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattgg tgaccccagc ccggggagga 600
gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttcccagaca ccgggccttg 660
cgcacagccc ccattccagcc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg 720
gtggtggagc cagaagggtg agcagtagct cct 753

<210> 30
<211> 1386
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<400> 30
atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg ggcctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
gtaggtgctc aaacatcac agcccggtatt ggcgagccac tgggtgctga gtgtaagggg 120
gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
tggaagggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
aacggtctcc tcttctctcc ggtgtctggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tccaataag 420
gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat 480
gggaagcccc tggtgcccaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac 540
cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattgg tgaccccagc ccggggagga 600
gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttcccagaca ccgggccttg 660
cgcacagccc ccattccagcc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg 720
gtggtggagc cagaagggtg agcagtagct cctccgtcag tcttctctt cccccaaaa 780
cccaaggaca cctcatgat ctcccggaac cctgaggta catgcgtggt ggtggacgtg 840
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtaogtgg acggcgtgga ggtgcataat 900
gccaagacaa agccgogggg ggagcagtae aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc 960

294
285

28

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa 1020
 gccctcccag ccccatcga gaaacacac tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1080
 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggc cagcctgacc 1140
 tgcctgggtca aaggcttcta toccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
 coggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcttc 1260
 tacagcaago tcacgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
 gtgatgcag aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
 aatga 1386

<210> 31
 <211> 1041
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<400> 31
 atggcagccg gaaacagcagt tggagccctgg gtgctggctc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtagggtgctc aaaacatcac agcccggtt ggcgagccac tgggtgctga gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tggaaaggctc tgtctcccca gggaggaggc cctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttctcttc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag. 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaaactac gagtccgtgt ctacagatt 360
 cctgggaagc cagaatttgt agattctgcc totgaactca cggctggctc gtcagtcttc 420
 ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 480
 gtggtgggtg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 540
 gtggagggtgc ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cagctaccgt 600
 gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 660
 aaggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaa ccatctccaa agccaaaggg 720
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 780

295
ZCA

29

caggtcagcc tgacctgcct ggtcannagcc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 840
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac agaccacgc ctcccgtsct ggactccgac 900
 ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 960
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1020
 tccctgtctc cgggtaatg a 1041

<210> 32
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<400> 32

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Ala Leu Val Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
 20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
 35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
 50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
 65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
 85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
 100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp

296
295

30

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

297
267

32

20

25

30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

298
296

31

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380

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

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

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

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 33
<211> 439
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<400> 33

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn

299.
298

33

Gly Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

300
299

34

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 34

<211> 438

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence

<400> 34

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

301

35

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
225 230 235 240

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
245 250 255

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
260 265 270

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
275 280 285

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
290 295 300

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
305 310 315 320

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
325 330 335

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
340 345 350

302
281

36

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
355 360 365

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
370 375 380

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
385 390 395 400

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
405 410 415

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
420 425 430

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 35
<211> 346
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<400> 35

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

303.
202

37

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
130 135 140

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
145 150 155 160

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
165 170 175

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
180 185 190

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
195 200 205

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
210 215 220

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
225 230 235 240

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
245 250 255

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
260 265 270

304
287

38

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
275 280 285

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
290 295 300

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
305 310 315 320

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
325 330 335

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345

<210> 36
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<400> 36

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

305
2001

39

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
115 120 125

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
130 135 140

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
145 150 155 160

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
165 170 175

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
245 250 255

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
260 265 270

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

306
305

40

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
290 295 300

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 37

<211> 323

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<400> 37

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

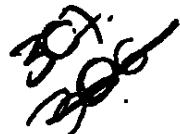
Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

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

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110



Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
115 120 125

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
130 135 140

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
145 150 155 160

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
165 170 175

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
195 200 205

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
210 215 220

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
225 230 235 240

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
245 250 255

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
260 265 270

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
290 295 300

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
305 310 315 320

300
250X

42

Pro Gly Lys

<210> 38
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Homo, sapiens

<400> 38

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 1 5 10 15

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 35 40 45

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 50 55 60

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 65 70 75 80

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 85 90 95

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 100 105 110

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 115 120 125

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 130 135 140

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 145 150 155 160

43

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
165 170 175

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
180 185 190

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
195 200 205

Gly Lys
210

<210> 39
<211> 633
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
ccgtcagttc tctctctccc cccaaacccc agggacaccc tcatgatctc ccggacccct 60
gaggtcacat gcgtgggtggg ggacgtgagc caccagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 120
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac 180
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactgggt gaatggcaag 240
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctccagccc ccacgagaa aaccatctcc 300
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccacc ccgggatgag 360
ctgaccaaga accaggtcag cctgaacctg ctggtcaaag gottctatcc cagcgacacc 420
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 480
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 540
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 600
cagaagagcc tctccctgtc tcgggttaa tga 633

<210> 40
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens

310
254

44

<400> 40

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
115 120 125

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

195	200	205
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
210	215	220
<210> 41		
<211> 663		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 41		
ccgtgccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tctctttccc cccaaaaccc	60	
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc gaggtcacat gcgtgggtgt ggaagtgagc	120	
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	180	
aagacaango cgcgggagga gcagtacaac agcagctacc gtgtgggtcag cgtcctcacc	240	
gtcctgcacc aggactggct gaatggcag gagtacaagt gcaaggtctc caacaagcc	300	
ctccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	360	
gtgtacacc tgcgccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	420	
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	480	
gagaacaact acaagaccac gcctcccgts ctggactccg acggctcctt cttcctctac	540	
agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg	600	
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	660	
tga	663	
<210> 42		
<211> 113		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 42		
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
1	5	10 15
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
20	25	30

3/2
3/11

46

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

313
312

47

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 44
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
20 25

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

314
313

Applicant's or agent's file reference TTP 2004-03	FOR FURTHER ACTION	See item 4 below
International application No. PCT/US2005/027694	International filing date (day/month/year) 03 August 2005 (03.08.2005)	Priority date (day/month/year) 03 August 2004 (03.08.2004)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant TRANSTECH PHARMA, INC.		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).																
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.																
3. This report contains indications relating to the following items: <table><tr><td>☒ Box No. I</td><td>Basis of the report</td></tr><tr><td>☐ Box No. II</td><td>Priority</td></tr><tr><td>☒ Box No. III</td><td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td></tr><tr><td>☐ Box No. IV</td><td>Lack of unity of invention</td></tr><tr><td>☒ Box No. V</td><td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td></tr><tr><td>☐ Box No. VI</td><td>Certain documents cited</td></tr><tr><td>☐ Box No. VII</td><td>Certain defects in the international application</td></tr><tr><td>☐ Box No. VIII</td><td>Certain observations on the international application</td></tr></table>	☒ Box No. I	Basis of the report	☐ Box No. II	Priority	☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☐ Box No. IV	Lack of unity of invention	☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☐ Box No. VI	Certain documents cited	☐ Box No. VII	Certain defects in the international application	☐ Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒ Box No. I	Basis of the report															
☐ Box No. II	Priority															
☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability															
☐ Box No. IV	Lack of unity of invention															
☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement															
☐ Box No. VI	Certain documents cited															
☐ Box No. VII	Certain defects in the international application															
☐ Box No. VIII	Certain observations on the international application															
4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).																

	Date of issuance of this report 06 February 2007 (06.02.2007)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Philippe Becamel e-mail: pt12.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

REC'D 13 DEC 2005

WIPO

PCT

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

16/02/06

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2005/027894

International filing date (day/month/year)
03.08.2005

Priority date (day/month/year)
03.08.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C12N15/82, C07K14/705, A61K38/17

Applicant
TRANSTECH PHARMA, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 86.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80288 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Barnas, C

Telephone No. +49 89 2399-7469



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **3K**
PCT/US2005/027694 **315**

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☒ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **317**
PCT/US2005/027694 **21/8**

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 29-58 (part)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 29-58 (part) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(I) with regard to novelty, Inventive step or Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	22
	No: Claims	1-21, 23-58
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	22
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-28
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

319
318

The documents mentioned in the present Written Opinion are numbered as in the International Search Report. D1 corresponds to the first document of the Search Report, D2 to the second document etc.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 29-58 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

For the assessment of the present claims 29-58 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Art. 33(2) PCT, Novelty

D1 discloses fusion proteins comprising a RAGE polypeptide or an sRage polypeptide comprising a RAGE ligand binding site linked to a polypeptide comprising an immunoglobulin domain such as a CH2 or CH3 domain of a human IgG. The RAGE polypeptide comprises the amino acid sequences indicated in claims 4-8. The indication of said sequences does therefore not confer novelty over D1.

D1 discloses further nucleic acids encoding said fusion protein.

320
319

D1 further discloses a method for the detection of RAGE modulators as indicated in claim 27.

D1 further discloses the therapeutic use of said fusion protein comprising administrations as indicated in present claims 34-36 for RAGE related diseases (see p. 33-35) and in the form of injectable solutions.

D1 is therefore novelty destroying for claims 1-21, 23-58.

2. Art. 33(3) PCT, Inventive Step

2.1. The subject matter of claim 22 is the outcome of routine procedures that the skilled person would apply starting from D1 without the exercise of inventive skill. Said claim is therefore not inventive.

2.2. Claims 1, 4-9, 12-16, 19-28 embrace fusion proteins comprising a RAGE polypeptide linked to any second non-RAGE polypeptide. The present application does however not indicate any effect resulting from linking RAGE to any second non-RAGE polypeptide. Such a fusion protein is therefore the outcome of an arbitrary modification that does not result in any specific effect. Such an arbitrary modification does, however, not involve an inventive step. Said claims are therefore not inventive.

2.3. Claims 2, 3, 10, 11, 17, 18 embrace fusion proteins comprising a RAGE polypeptide linked to any portion of an immunoglobulin domain including portions that consist of only one amino acid. Such a fusion protein however represents an arbitrary modification that does not result in any specific effect. Said claims are therefore not inventive.

The attention of the applicant is drawn to the fact that a reply to this opinion is only expected if he intends to file a chapter II demand.

321
370

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:
CALKINS, Charles, W. Kilpatrick Stockton, LLP 1001 West Fourth Street Winston-Salem, NC 27101 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 18 December 2006 (18.12.2006)	
Applicant's or agent's file reference TJP 2004-03	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2005/027694	International filing date (day/month/year) 03 August 2005 (03.08.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address MJALLI, Adnan, M.M. 2902 Ellington Ct. Jamestown, NC 27282 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality	☐ the residence	
Name and Address MJALLI, Adnan, M.M. 6421 Ashton Park Drive Oak Ridge, NC 27310 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:	
☒ the receiving Office	☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Lachavanne Mylene
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 70 90 Telephone No. +41 22 338 95 21

322
281

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 17 January 2007 (17.01.2007)	To: CALKINS, Charles, W. Kilpatrick Stockton, LLP 1001 West Fourth Street Winston-Salem, NC 27101 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
Applicant's or agent's file reference TTP 2004-03	
International application No. PCT/US2005/027894	
IMPORTANT NOTIFICATION	
International filing date (day/month/year) 03 August 2005 (03.08.2005)	

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address STERN, David, M. One 7th Street Augusta, GA 30901 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address STERN, David, M. 8460 Springvalley Road Cincinnati, Ohio 45236 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Gaspais Stephane Facsimile No. +41 22 338 70 90 Telephone No. +41 22 338 81 49
---	--

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

CALKINS, Charles, W.
Kilpatrick Stockton, LLP
1001 West Fourth Street
Winston-Salem, NC 27101
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)
30 January 2007 (30.01.2007)

Applicant's or agent's file reference
TTP 2004-03

International application No.
PCT/US2005/027694

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
03 August 2005 (03.08.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☒ the name ☒ the address ☒ the nationality ☒ the residence

Name and Address SCHMIDT, Ann, Marie 242 Haven Road Franklin Lakes, NJ 07417 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as Applicant for the US only and Inventor for all designated states.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Appave Jose
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 70 90 Telephone No. +41 22 338 81 53

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

CALKINS, Charles, W.
Kilpatrick Stockton, LLP
1001 West Fourth Street
Winston-Salem, NC 27101
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 27 February 2007 (27.02.2007)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference TTP 2004-03	
International application No. PCT/US2005/027694	International filing date (day/month/year) 03 August 2005 (03.08.2005)

1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: ☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence		
Name and Address YAN, Shi, Du 58 Hamilton Place Tenafly, NJ 07670 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 has been added as Applicant for the US only and inventor for all designated states.		
4. A copy of this notification has been sent to: ☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned ☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned ☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:		
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70		Authorized officer Appave Jose Facsimile No. +41 22 338 70 90 Telephone No. +41 22 338 81 53

325
324

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

CALKINS, Charles, W.
Kilpatrick Stockton, LLP
1001 West Fourth Street
Winston-Salem, NC 27101
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)
30 January 2007 (30.01.2007)

Applicant's or agent's file reference
TTP 2004-03

International application No.
PCT/US2005/027694

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
03 August 2005 (03.08.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☒ the name ☒ the address ☒ the nationality ☒ the residence

Name and Address THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK West 116th Street & Broadway New York, NY 10027 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as Applicant for all designated states except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Appave Jose Facsimile No. +41 22 338 70 90 Telephone No. +41 22 338 81 53
---	---

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference TTP 2004-03	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2005/027694	International filing date (day/month/year) 03/08/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 03/08/2004
Applicant TRANSTECH PHARMA, INC.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2005/027694

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the International search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the International application as filed
 - ☐ filed together with the International application in computer readable form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US2005/027694

328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/62 C07K14/705 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/016229 A (WYETH; IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED; PITTMAN, DEBRA, D; CLANCY) 26 February 2004 (2004-02-26) page 1, lines 19-24 page 7, lines 3-16 page 12, lines 9-19 page 17, lines 10-17 page 33, line 6 - page 35, line 18 page 40, lines 13-17	1-58



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 December 2005

Date of mailing of the international search report

15/12/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Barnas, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/027694

328
329

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29-58 (part)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 29-58 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2005/027694

330

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004016229 A	26-02-2004	AU 2003265505 A1	03-03-2004
		CA 2495663 A1	26-02-2004
		EP 1575513 A2	21-09-2005



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Eduar Nario

Firma Responsable

Fecha 03-02-2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: Info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

332.

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 331

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
RAISBECK J. IAN
Apoderado(a) y/o Representante de
TRANSTECH PHARMA, INC

REFERENCIA	Radicación No.	07 21336
	Solicitud internacional	PCT/US2005/027694
	Fecha inicio fase nacional	03/03/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	3104
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

24 MAY 2007

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa11