



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 772**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02734478 .7**
96 Fecha de presentación : **20.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1436003**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **Proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina.**

30 Prioridad: **24.05.2001 US 293343 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2010

73 Titular/es: **ZymoGenetics, Inc.**
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US

72 Inventor/es: **Rixon, Mark, W. y**
Gross, Jane, A.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 334 772 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere, en general, a proteínas de fusión mejoradas que comprenden un resto de receptor de factor de necrosis tumoral y un resto de inmunoglobulina. En concreto, la presente invención se refiere a proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina mejoradas.

10 **Antecedentes de la invención**

Las citocinas son proteínas pequeñas solubles que median en una variedad de efectos biológicos, incluyendo la regulación del crecimiento y de la diferenciación de muchos tipos de células (véase, por ejemplo, Arai *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 59:783 (1990); Mosmann, *Curr. Opin. Immunol.* 3:311 (1991); Paul y Seder, *Cell* 76:241 (1994)). Las proteínas que constituyen el grupo de las citocinas incluyen interleucinas, interferones, factores de estimulación de colonias, factores de necrosis tumoral y otras moléculas reguladoras. Por ejemplo, la interleucina-17 humana es una citocina que estimula la expresión de la interleucina-6, la molécula de adhesión intracelular 1, la interleucina-8, el factor de estimulación de colonias de macrófagos de granulocitos y la expresión de la prostaglandina E2, y desempeña un papel en la maduración preferencial de los precursores hematopoyéticos CD34+ en neutrófilos (Yao *et al.*, *J. Immunol.* 155:5483 (1995); Fossiez *et al.*, *J. Exp. Med.* 183:2593 (1996)).

Los receptores que se unen a las citocinas están compuestos comúnmente por una o más proteínas integrales de membrana que se unen a la citocina con una afinidad elevada y transducen esta unión con la célula a través de partes citoplasmáticas de ciertas subunidades de los receptores. Los receptores de citocinas han sido agrupados en varias clases en base a las semejanzas entre sus dominios de unión con ligandos extracelulares. Por ejemplo, las cadenas de los receptores responsables de la unión y/o la transducción del efecto de los interferones son miembros de la familia de receptores de citocinas de tipo II, en base a un dominio extracelular característico de 200 residuos.

Las interacciones celulares que tienen lugar durante una respuesta inmune están reguladas por miembros de varias familias de receptores de la superficie celular, incluyendo la familia de los receptores de los factores de necrosis tumoral (TNFR, *Tumor Necrosis Factor Receptors*). La familia de los TNFR consta de un número de receptores glicoproteínicos integrales de membrana, muchos de los cuales, en combinación con sus respectivos ligandos, regulan las interacciones entre los diferentes linajes celulares hematopoyéticos (véase, por ejemplo, Cosman, *Stem Cells* 12:440 (1994); Wajant *et al.*, *Cytokine Growth Factor Rev.* 10: 15 (1999); Yeh *et al.*, *Immunol. Rev.* 169:283 (1999); Idriss y Naismith, *Microsc. Res. Tech.* 50:184 (2000)).

Uno de tales receptores es el TACI (*transmembrane activator and CAML-interactor*), activador transmembrana e interaccionador con el CAML (von Bülow y Bram, *Science* 228:138 (1997); Bram y von Bülow, patente estadounidense n.º 5.969.102 (1999)). El TACI es un receptor unido a la membrana que tiene un dominio extracelular que contiene dos pseudo-repeticiones ricas en cisteína, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático que interacciona con el CAML (*CALcium-Modulator and cyclophilin Ligand*), modulador del calcio y ligando de la ciclofilina), una proteína integral de membrana ubicada en las vesículas intracelulares que es co-inductora de la activación de los NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T cells*, factores nucleares de células T activadas) cuando se sobreexpresa en células Jurkat. El TACI se asocia con células B y un subconjunto de células T. Las secuencias de nucleótidos que codifican el TACI y su correspondiente secuencia de aminoácidos se proporcionan en la presente memoria como las SEC ID N.º 1 y 2, respectivamente.

El receptor TACI se une con dos miembros de la familia de ligandos de los factores de necrosis tumoral (TNF, *Tumor Necrosis Factor*). Un ligando se nombra de forma muy diversa ZTNF4, "BAFF", "neutrocina- α ", "BLyS", "TALL-1" y "THANK" (Yu *et al.*, Publicación internacional n.º WO98/18921 (1998), Moore *et al.*, *Science* 285:269 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, *J Biol. Chem.* 274:15978 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.* 189:1747 (1999); Shu *et al.*, *J Leukoc. Biol.* 65:680 (1999)). La secuencia de aminoácidos de ZTNF4 se proporciona como SEC ID N.º 3. El otro ligando ha sido nombrado "ZTNF2", "APRIL" y "ligando inductor de la apoptosis de los TNFR 1" (Hahne *et al.*, *J Exp. Med.* 188:1185 (1998); Kelly *et al.*, *Cancer Res.* 60:1021 (2000)). La secuencia de aminoácidos de ZTNF2 se proporciona como SEC ID N.º 4. Ambos ligandos también son unidos por el receptor de maduración de células B (BCMA, *B-Cell MAturation receptor*) (Gross *et al.*, *Nature* 404:995 (2000)). Las secuencia de nucleótidos y la de aminoácidos del BCMA se proporcionan como la SEC ID N.º 26 y la SEC ID N.º 27, respectivamente.

Las actividades demostradas *in vivo* de los receptores de los factores de necrosis tumoral ilustran el potencial clínico de las formas solubles del receptor. Las formas solubles del receptor TACI han sido generadas como proteínas de fusión de inmunoglobulina. Las versiones iniciales dieron como resultado una proteína heterogénea de baja expresión. La heterogeneidad se observó en el terminal amino de TACI, en el terminal carboxilo del Fc, y en la región del tallo del TACI. Existe, por tanto, la necesidad de composiciones de receptor TACI farmacéuticamente útiles.

El documento WO 00/40716 describe polipéptidos secretados solubles y sus usos para detectar ligandos, agonistas y antagonistas, así como procedimientos que modulan la activación de las células B.

El documento WO 01/81417 describe el TACI como un agente anti-humano.

La presente invención proporciona el uso de una proteína de fusión de activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina-inmunoglobulina para la fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación de células tumorales, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende: (a) un resto de receptor TACI que consta de un fragmento de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 30 a 154 de la SEC ID N.º 2, en la que el resto de receptor TACI consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (i) los residuos de aminoácido 34 a 104 de la SEC ID N.º 2, (ii) los residuos de aminoácido 30 a 110 de la SEC ID N.º 2; y (iii) los residuos de aminoácido 30 a 154 de la SEC ID N.º 2; y en la que el resto de receptor TACI se une al menos con uno entre ZTNF2 o ZTNF4, y (b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

Por tanto, la presente invención también proporciona una proteína de fusión que comprende: (a) un resto de receptor activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina (TACI), en la que el resto de receptor TACI consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: (i) los residuos de aminoácido 34 a 104 de la SEC ID N.º 2, (ii) los residuos de aminoácido 30 a 110 de la SEC ID N.º 2 y (iii) los residuos de aminoácido 30 a 154 de la SEC ID N.º 2; en la que el resto de receptor TACI se une al menos con uno entre ZTNF2 o ZTNF4, y (b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

La presente invención proporciona mejores proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina adecuadas como compuestos terapéuticos.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos del TACI humano. Las ubicaciones de las pseudo-repeticiones ricas en cisteína se indican en sombreado, el dominio transmembrana está encuadrado y la región del tallo se indica con una línea discontinua.

La Figura 2 es un diagrama esquemático de una inmunoglobulina de la subclase de IgG1. C_L: región constante de las cadenas ligeras; C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}: regiones constantes de las cadenas pesadas; V_L: región variable de las cadenas ligeras; V_H: región variable de las cadenas pesadas; CHO: hidrato de carbono; N: terminal amino; C: terminal carboxilo.

Las figuras 3A, 3B, 3C y 3D muestran una comparación de la secuencia de aminoácidos del Fc de la región constante $\gamma 1$ humana de tipo natural con las variantes Fc-488, Fc4, Fc5, Fc6, Fc7 y Fc8. El dominio C_{H1} de la región constante $\gamma 1$ humana no forma parte del Fc y, por tanto, no se muestra. Se indica la ubicación de la región bisagra, y de los dominios C_{H2} y C_{H3}. Se indican los residuos de Cys que normalmente están implicados en la unión mediante enlaces de tipo disulfuro con la región constante de cadena ligera (LC) y la región constante de cadena pesada (HC). Un símbolo "." indica la identidad con el tipo natural en esa posición, mientras que "***" indica la ubicación del terminal carboxilo e ilustra la diferencia en el terminal carboxilo de Fc6 en comparación con las otras versiones de Fc. Las ubicaciones de los aminoácidos se indican con las posiciones de los índices EU.

La figura 4 muestra la unión específica de ¹²⁵I-ZTNF4 con diversos constructos de TACI-Fc. Las proteínas de fusión de TACI-Fc tenían restos de TACI que carecían de los primeros 29 residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2. Una de las proteínas de fusión tenía un resto de TACI con una región del tallo intacta (TACI (d1-29)-Fc5), mientras que tres de las proteínas de fusión de TACI-Fc tenían restos de TACI con diversas eliminaciones en la región del tallo (TACI (d1-29, d107-154)-Fc5; TACI (d1-29, d111-154)-Fc5; TACI (d1-29, d120-154)-Fc5). En la tabla 4, se describen los datos experimentales.

Descripción detallada de la invención

1. Perspectiva general

Según lo descrito más adelante, la presente invención proporciona proteínas de fusión de activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina según lo definido en las reivindicaciones, y los usos de las mismas según lo definido en las reivindicaciones. Por ejemplo, la presente invención proporciona usos para inhibir la proliferación de células tumorales que comprenden el uso de una composición que comprende una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina según lo definido en las reivindicaciones. Tal composición se puede administrar a células cultivadas *in vitro*. La composición puede ser una composición farmacéutica que comprenda un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina, y la composición farmacéutica puede ser para administrarla a un sujeto que tenga un tumor. El sujeto puede ser un sujeto mamífero. La administración de la composición farmacéutica puede inhibir, por ejemplo, la proliferación de linfocitos B en un sujeto mamífero.

La presente memoria describe usos para inhibir la actividad de ZTNF4 en un mamífero, que comprenden administrar al mamífero una composición que comprende una TACI-inmunoglobulina. La actividad de ZTNF4 puede estar asociada con diversas enfermedades y trastornos. Por ejemplo, se puede usar una composición farmacéutica que comprenda una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para tratar una enfermedad autoinmune, tal como lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de la insulina, enfermedad

de Crohn, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil de curso poliarticular y artritis psoriática. Alternativamente, se puede usar una composición farmacéutica que comprenda una TACI-inmunoglobulina para tratar un trastorno tal como asma, bronquitis, enfisema y insuficiencia renal en estadio final. También es posible usar una composición farmacéutica que comprenda una TACI-inmunoglobulina para tratar la enfermedad renal, tal como glomerulonefritis, vasculitis, nefritis, amiloidosis y pielonefritis, o un trastorno tal como neoplasma, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de no Hodgkin, enfermedad linfoproliferativa posterior a un trasplante y gammopatía de cadena ligera. En ciertos casos, la actividad de ZTNF4 puede estar asociada con las células T. También se puede usar una composición farmacéutica que comprenda una TACI-inmunoglobulina para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la inmunosupresión, el rechazo de injertos, la enfermedad del injerto frente al huésped y la inflamación. Por ejemplo, se puede usar una composición farmacéutica que comprenda una TACI-inmunoglobulina para disminuir la inflamación y tratar trastornos tales como el dolor de articulaciones, la hinchazón, la anemia y el choque séptico.

La presente memoria describe usos para reducir los niveles de circulación en sangre de ZTNF4 en un sujeto mamífero que comprenden administrar al sujeto mamífero una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina, en los que la administración de la composición farmacéutica reduce el nivel de circulación en sangre de ZTNF4 del sujeto mamífero. A modo ilustrativo, la administración de tal composición farmacéutica puede reducir los niveles de circulación en sangre de ZTNF4 en al menos el 10%, en al menos el 20%, en al menos del 10 al 50%, en al menos del 20 al 50%, o en al menos del 30 al 40%, en comparación con el nivel en sangre de ZTNF4 antes de la administración de la composición farmacéutica. Los expertos en la técnica pueden medir los niveles de circulación de ZTNF4. En el ejemplo 4 y el ejemplo 5, se describen procedimientos ilustrativos.

Según lo descrito más adelante, las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina comprenden:

(a) un resto de receptor TACI que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: los residuos de aminoácido 34 a 104 de la SEC ID N.º 2; los residuos de aminoácido 30 a 110 de la SEC ID N.º 2; y los residuos de aminoácido 30 a 154 de la SEC ID N.º 2, y

(b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

El resto de inmunoglobulina de una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina puede comprender una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de cadena pesada humana. Una región constante de cadena pesada de IgG1 es un ejemplo de una región constante de cadena pesada adecuada. Una región constante de cadena pesada de IgG1 ilustrativa es un fragmento Fc de IgG1 que comprende los dominios C_{H2} y C_{H3}. El fragmento Fc de IgG1 puede ser un fragmento Fc de IgG1 de tipo natural o un fragmento de Fc de IgG1 mutado, tal como el fragmento Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 33. Una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina ejemplar es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 54.

Las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina descritas en la presente memoria pueden ser multímeros, tales como dímeros.

La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico (según lo definido en las reivindicaciones) que codifican una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina. La SEC ID N.º 53 proporciona una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina.

La presente memoria de invención describe receptores solubles TACI que constan de un fragmento de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 30 a 154 de la SEC ID N.º 2, en los que el resto de receptor soluble TACI comprende al menos una entre (i) los residuos de aminoácido 34 a 66 de la SEC ID N.º 2 y (ii) los residuos de aminoácido 71 a 104 de la SEC ID N.º 2; y en los que el receptor soluble TACI se une al menos con uno entre ZTNF2 o ZTNF4. En la presente memoria, se describen otros receptores solubles TACI como restos de receptor TACI adecuados para las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina. Además, los receptores solubles TACI se pueden usar en procedimientos descritos para las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina.

Éstos y otros aspectos de la invención se harán evidentes tras consultar la siguiente descripción detallada y las siguientes figuras. Además, más adelante, se identifican diversas referencias.

2. Definiciones

En la siguiente descripción, se usa ampliamente una serie de términos. Las siguientes definiciones se proporcionan con el fin de facilitar la comprensión de la invención.

Como se usa en la presente memoria, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados mediante cualquier unión, escisión,

acción de endonucleasas y acción de exonucleasas. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos naturales (tales como ADN y ARN) o análogos de nucleótidos naturales (p. ej., formas α -enantioméricas de nucleótidos naturales) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en los restos de azúcar y/o en los restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de los azúcares incluyen, por ejemplo, la sustitución de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden estar funcionalizados como éteres o ésteres. Además, puede que todo el resto de azúcar esté reemplazado con estructuras estéricamente y electrónicamente similares, tales como aza-azúcares y análogos de azúcar carbocíclicos. Los ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos por enlaces de tipo fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los análogos de enlaces de tipo fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforanilidato, fosforamidato y similares. El término “molécula de ácido nucleico” también incluye los denominados “ácidos nucleicos peptídicos”, que comprenden bases de ácido nucleico naturales o modificadas unidas a una estructura de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser bien monocatenarios o bicatenarios.

El término “complemento de una molécula de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y una orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' (SEC ID N.º 57) es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3' (SEC ID N.º 58).

El término “cóntigo” denota una molécula de ácido nucleico que tiene un tramo contiguo de secuencia idéntica o complementaria a otra molécula de ácido nucleico. Se dice que las secuencias contiguas se “superponen” con un tramo dado de una molécula de ácido nucleico bien en su totalidad o a lo largo de un tramo parcial de la molécula de ácido nucleico.

El término “secuencia de nucleótidos degenerada” denota una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados en comparación con una molécula de ácido nucleico de referencia que codifica un polipéptido. Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácido (es decir, los tripletes GAU y GAC codifican Asp).

El término “gen estructural” se refiere a una molécula de ácido nucleico que transcrita a ARN mensajero (ARNm), que luego es traducido en una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

Una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que ha sido separada del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que ha sido aislada de una determinada especie es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de esa especie.

Un “constructo de una molécula de ácido nucleico” es una molécula de ácido nucleico, bien monocatenaria o bicatenaria, que ha sido modificada mediante la intervención humana para que contenga segmentos de ácido nucleico combinados y yuxtapuestos en una disposición que no existe en la naturaleza.

“ADN lineal” denota moléculas de ADN no circulares que tienen los extremos 5' y 3' libres. Se puede preparar ADN lineal a partir de moléculas de ADN circulares cerradas, tales como plásmidos, mediante digestión enzimática o alteración física.

“ADN complementario (ADNc)” es una molécula de ADN monocatenaria que se forma a partir de un molde de ARNm por la enzima transcriptasa inversa. Comúnmente, se emplea un cebador complementario a partes del ARNm para iniciar la transcripción inversa. Los expertos en la técnica también usan el término “ADNc” para referirse a una molécula de ADN bicatenaria que consta de tal molécula de ADN monocatenaria y su cadena de ADN complementaria. El término “ADNc” también se refiere a un clon de una molécula de ADNc sintetizada a partir de un molde de ARN.

Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Comúnmente, el promotor se ubica en la región 5' no codificante de un gen, en posición proximal al sitio de iniciación de la transcripción de un gen estructural. Los elementos secuenciales de los promotores que funcionan en el inicio de la transcripción se caracterizan a menudo por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos de los promotores incluyen sitios de unión a la ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de la diferenciación (DSE, *Differentiation Specific Elements*; McGehee *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 7:551 (1993)), elementos de respuesta al AMP cíclico (CRE, *Cyclic AMP Response Elements*), elementos de respuesta al suero (SRE, *Serum Response Elements*; Treisman, *Seminars in Cancer Biol.* 1:47 (1990)), elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE, *Glucocorticoid Response Elements*) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRF/ATF (O'Reilly *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:19938 (1992)), AP2 (Ye *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:25728 (1994)), SP1, proteína de unión para los elementos de respuesta a AMPc (CREB, *cAMP Response Element Binding Protein*; Loeken, *Gene Expr.* 3:253 (1993)) y factores octaméricos (véase, en general, Watson *et al.*, eds., “Molecular Biology of the Gene”, IV ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987) y Lemaigre y Rousseau, *Biochem. J.* 303:1 (1994)). Si un promotor

ES 2 334 772 T3

es un promotor inducible, entonces la velocidad de transcripción aumenta como respuesta a un agente inductor. Por el contrario, la velocidad de transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen los promotores represibles.

5 Un “promotor central” contiene secuencias de nucleótidos esenciales para la función del promotor, incluyendo la caja TATA y el inicio de la transcripción. Mediante esta definición, un promotor central puede o no puede tener una actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden aumentar la actividad o conferir una actividad específica de un tejido.

10 Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor central. Por ejemplo, un elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une con factores celulares que permiten la transcripción exclusiva o de forma preferente en determinadas células, tejidos u orgánulos. Estos tipos de elementos reguladores están normalmente asociados con genes que se expresan de un modo “específico para una célula”, “específico para un tejido” o “específico para un orgánulo”.

15 Un “potenciador” es un tipo de elemento regulador que puede aumentar la eficacia de la transcripción, independientemente de la distancia o de la orientación del potenciador con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

20 “ADN heterólogo” se refiere a una molécula de ADN o una población de moléculas de ADN que no existe de manera natural en una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas a una determinada célula huésped pueden contener ADN derivado de la especie de la célula huésped (es decir, ADN endógeno) siempre y cuando el ADN huésped esté combinado con ADN no huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no huésped que codifica un polipéptido unido operativamente a un segmento de ADN huésped que comprende un promotor de la transcripción se considera una molécula de ADN heteróloga. Por
25 el contrario, una molécula de ADN heteróloga puede comprender un gen endógeno unido operativamente con un promotor exógeno. Como otro ejemplo, una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula de tipo natural se considera ADN heterólogo si esa molécula de ADN está introducida en una célula mutante que carece del gen de tipo natural.

30 Un “polipéptido” es un polímero de residuos de aminoácido unidos mediante enlaces peptídicos, bien producido de manera natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácido se denominan comúnmente “péptidos”.

35 Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos se pueden añadir a una proteína a través de la célula en la que la proteína es producida, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras de aminoácidos; los sustituyentes tales como los grupos carbohidrato generalmente no se especifican, aunque pueden estar presentes.

40 Un péptido o un polipéptido codificado por una molécula de ADN no huésped es un péptido o un polipéptido “heterólogo”.

45 Un “elemento genético integrado” es un segmento de ADN que ha sido incorporado a un cromosoma de una célula huésped tras introducir ese elemento en la célula mediante manipulación humana. Lo más común es que, en la presente invención, los elementos genéticos integrados estén derivados de plásmidos linealizados que son introducidos en las células mediante electroporación u otras técnicas. Los elementos genéticos integrados son transmitidos de la célula huésped original a su progenie.

50 Un “vector de clonación” es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, un cósmico o un bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de manera autónoma en una célula huésped. Los vectores de clonación contienen comúnmente un o un número pequeño de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que permite la inserción de una molécula de ácido nucleico de una manera determinable sin la pérdida de una función biológica esencial del vector, así como las secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para su uso en la identificación y la selección de células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores
55 incluyen comúnmente genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o resistencia a la ampicilina.

60 Un “vector de expresión” es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que es expresado en una célula huésped. Comúnmente, un vector de expresión comprende un promotor de la transcripción, un gen y un terminador de la transcripción. La expresión génica habitualmente es colocada bajo el control de un promotor y se dice que tal gen está “unido operativamente” al promotor. De manera similar, un elemento regulador y un promotor central están ligados operativamente si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

65 Un “huésped recombinante” es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heteróloga, tal como un vector de clonación o un vector de expresión. En el presente contexto, un ejemplo de un huésped recombinante es una célula que produce una proteína de fusión de TACI-Fc a partir de un vector de expresión.

Los “transformantes integradores” son células huésped recombinantes en las que el ADN heterólogo se ha integrado en el ADN genómico de las células.

Una “proteína de fusión” es una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos de al menos dos genes. Por ejemplo, una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende un resto de receptor TACI y un resto de inmunoglobulina. Como se usa en la presente memoria, un “resto de receptor TACI” es una parte del dominio extracelular del receptor TACI que se une con al menos uno entre ZTNF2 o ZTNF4. El término “resto de inmunoglobulina” se refiere a un polipéptido que comprende una región constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, el resto de inmunoglobulina puede comprender una región constante de cadena pesada. El término proteína de fusión de “TACI-Fc” se refiere a una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina en la que el resto de inmunoglobulina comprende regiones constantes de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina, CH2 y CH3.

El término “receptor” denota una proteína asociada a una célula que se une a una molécula bioactiva denominada “ligando”. Esta interacción media el efecto del ligando sobre la célula. En el contexto de la unión del receptor TACI, el término “que se une específicamente” o “unión específica” se refiere a la capacidad del ligando para unirse competitivamente con el receptor. Por ejemplo, ZTNF4 se une específicamente con el receptor TACI, y esto se puede ver observando la competición por el receptor TACI entre ZTNF4 marcado detectablemente y ZTNF4 sin marcar.

Los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o nucleares; monoméricos (p.ej., el receptor de la hormona estimulante de la tiroides, receptor beta-adrenérgico) o multiméricos ((p.ej., receptor del PDGF, receptor de hormonas del crecimiento, receptor de la IL-3; receptor del GM-CSF, receptor del G-CSF, receptor de la eritropoyetina y receptor de la IL-6). Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio de unión a ligandos extracelular y un dominio efector intracelular que está comúnmente implicado en la transducción de señales. En ciertos receptores unidos a la membrana, el dominio extracelular de unión a ligandos y el dominio efector intracelular se ubican en polipéptidos separados que comprenden el receptor funcional completo.

En general, la unión del ligando al receptor da como resultado un cambio configuracional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y otra u otras moléculas de la célula, lo que a su vez conduce a una alteración del metabolismo de la célula. Los hechos metabólicos que suelen estar ligados a las interacciones entre receptor y ligando incluyen la transcripción génica, la fosforilación, la desfosforilación, los aumentos de la producción de AMP cíclico, la movilización del calcio celular, la movilización de lípidos de membrana, la adhesión celular, la hidrólisis de lípidos de inositol y la hidrólisis de fosfolípidos.

El término “secuencia señal de secreción” denota una secuencia de ADN que codifica un péptido (un “péptido de secreción”) que, como componente de un polipéptido de mayor tamaño, dirige el polipéptido más grande por una ruta de secreción de una célula en la que es sintetizado. El polipéptido más grande es comúnmente escindido para eliminar el péptido de secreción durante el tránsito por la ruta de secreción.

Un “polipéptido aislado” es un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como impurezas de carbohidratos, lípidos u otras proteínas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Comúnmente, una preparación de un polipéptido aislado contiene el polipéptido más grande en una forma muy purificada, es decir, al menos aproximadamente un 80% puro, al menos aproximadamente un 90% puro, al menos aproximadamente un 95% puro, más del 95% puro o más del 99% puro. Un modo de demostrar que una determinada preparación de proteínas contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una sola banda tras una electroforesis sobre gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS) de la preparación proteica y una tinción con azul brillante de Coomassie del gel. Sin embargo, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o, alternativamente, formas glicosiladas o derivadas.

Los términos “amino-terminal” y “carboxi-terminal” se usan en la presente memoria para indicar las posiciones dentro de los polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una determinada secuencia o posición de un polipéptido para indicar proximidad o una posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia colocada carboxi-terminalmente a una secuencia de referencia en un polipéptido está ubicada en posición proximal al terminal carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el terminal carboxilo del polipéptido completo.

El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en ARNm y la traducción del ARNm en uno o más polipéptidos.

El término “variante de empalme” se usa en la presente memoria para indicar formas alternativas de ARN transcrito desde un gen. La variación por empalme se produce de manera natural mediante el uso de sitios de corte y empalme alternativos de una molécula de ARN transcrito, o menos comúnmente, entre moléculas de ARN transcritas por separado, y puede dar como resultado varios ARNm transcritos del mismo gen. Las variantes de empalme pueden codificar polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos alterada. El término variante de empalme también se usa en la presente memoria para indicar un polipéptido codificado por una variante de empalme de un ARNm transcrito de un gen.

Como se usa en la presente memoria, el término “inmunomodulador” incluye citocinas, factores de crecimiento de células madre, linfotoxinas, moléculas co-estimuladoras, factores hematopoyéticos y análogos sintéticos de estas moléculas.

ES 2 334 772 T3

El término “par de complemento/anti-complemento” indica restos no idénticos que forman un par estable asociado no covalentemente en condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o la estreptavidina) son miembros prototípicos de un par de complemento/anti-complemento. Otros ejemplos de pares de complemento/anti-complemento incluyen pares de receptor/ligando, pares de anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos sentido/antisentido, y similares. Cuando se desea la posterior disociación del par de complemento/anti-complemento, el par de complemento/anti-complemento tiene preferiblemente una afinidad de unión menor de 10⁹ M⁻¹.

Un “fragmento de anticuerpo” es una parte de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

El término “fragmento de anticuerpo” también incluye un polipéptido sintético o diseñado genéticamente que se une a un antígeno específico, tal como polipéptidos que constan de la región variable de la cadena ligera, fragmentos “Fv” constituidos por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas de polipéptido monocatenarias recombinantes en las que las regiones variables de las cadenas ligera y pesada están conectadas por un ligador peptídico (“proteínas scFv”) y unidades mínimas de reconocimiento que constan de los residuos de aminoácido que imitan la región hipervariable.

Un “anticuerpo quimérico” es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las regiones determinantes de la complementariedad derivados de un anticuerpo de roedor, mientras que el resto de la molécula de anticuerpo está derivada de un anticuerpo humano.

Los “anticuerpos humanizados” son proteínas recombinantes en las que las regiones determinantes de la complementariedad murinas de un anticuerpo monoclonal han sido transferidas de las cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina murina a un dominio variable humano.

Como se usa en la presente memoria, un “agente terapéutico” es una molécula o un átomo que se conjuga con un resto de anticuerpo para producir un conjugado que es útil para una terapia. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes o colorantes fotoactivos y radioisótipos.

Un “marcador detectable” es una molécula o un átomo que puede ser conjugado con un resto de anticuerpo para producir una molécula útil para un diagnóstico. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos u otros restos marcadores.

El término “etiqueta de afinidad” se usa en la presente memoria para indicar un segmento de polipéptido que puede ser unido a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o la detección del segundo polipéptido, o para proporcionar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, se puede usar cualquier péptido o proteína para la que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específica como etiqueta de afinidad. Las etiquetas de afinidad incluyen un tracto de polihistidina, la proteína A (Nilsson *et al.*, *EMBO J.* 4:1075 (1985); Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol.* 198:3 (1991)), glutatión-S-transferasa (Smith y Johnson, *Gene* 67:31 (1988)), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82:7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6:1204 (1988)), péptido de unión a la estreptavidina, u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford *et al.*, “Protein Expression and Purification” 2:95 (1991). Las moléculas de ADN que codifican etiquetas de afinidad se pueden obtener de proveedores comerciales (p.ej., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Un “anticuerpo desnudo” es un anticuerpo entero, a diferencia de un fragmento de anticuerpo, que no está conjugado con un agente terapéutico. Los anticuerpos desnudos incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como ciertos anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados.

Como se usa en la presente memoria, el término “componente de anticuerpo” incluye tanto un anticuerpo entero como un fragmento de anticuerpo.

Un “inmunoconjugado” es un conjugado de un componente de anticuerpo con un agente terapéutico o un marcador detectable.

Un “polipéptido diana” o un “péptido diana” es una secuencia de aminoácidos que comprende, al menos, un epítipo y que está expresada en una célula diana, tal como una célula tumoral, o una célula que porta un antígeno de un agente infeccioso. Las células T reconocen los epítopos peptídicos presentados por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad a un polipéptido diana o a un péptido diana y, comúnmente, lisan la célula diana o reclutan otros inmunocitos para que se dirijan al sitio de la célula diana, matando de ese modo a la célula diana.

Un “péptido antigénico” es un péptido que se unirá a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad para formar un complejo de MHC-péptido (MHC, *Mayor Histocompatibility Complex*, Complejo mayor de histocompatibilidad) que es reconocido por una célula T, induciendo de ese modo una respuesta de linfocitos citotóxicos tras la presentación a la célula T. Por ende, los péptidos antigénicos son capaces de unirse a una molécula del complejo mayor

ES 2 334 772 T3

Además de la heterogeneidad provocada por la escisión en la región del tallo, también se observó heterogeneidad en los terminales amino y carboxilo. Con referencia a la SEC ID N.º 2, los terminales principales fueron descubiertos en los residuos de aminoácido 1, 10 y 13. Las diferencias en el terminal carboxilo reflejan la heterogeneidad natural de las inmunoglobulinas recombinantes y las proteínas de fusión de inmunoglobulina, que incluye la eliminación incompleta del residuo de lisina codificado carboxiterminalmente. Se encontró otro origen de la heterogeneidad en la naturaleza variable de la estructura de hidrato de carbono unida al dominio CH2 de inmunoglobulina codificado por Fc.

Se generaron nuevas versiones de TACI-Fc para tratar la heterogeneidad observada. Se diseñaron constructos que incluían al menos una de las siguientes variaciones en el resto de TACI: (1) se eliminaron partes de la región del tallo del TACI; (2) se sustituyó una parte de la región del tallo del TACI por una parte de la región del tallo del BCMA; (3) se mutó el residuo de arginina de la posición 119 para eliminar un posible sitio de escisión de furina; (4) se mutó el residuo de glutamina de la posición 121 para eliminar un posible sitio de escisión de furina; (5) se mutó el residuo de arginina de la posición 122 para eliminar un posible sitio de escisión mediante furina; (6) se mutaron el residuo de aminoácido de las posiciones 123 y 142 a residuos de aminoácido encontrados en las posiciones correspondientes del TACI murino; (7) se sustituyó la secuencia señal del otPA humano con una secuencia señal de la región variable de la cadena pesada humana; (8) se mutó el residuo de valina de la posición 29 en metionina, y se unió la secuencia señal del otPA en una posición amino-terminal con este residuo; y (9) se unió la secuencia señal otPA en una ubicación amino-terminal con el residuo de alanina de la posición 30.

También se introdujeron modificaciones en el resto de inmunoglobulina. En los vertebrados superiores, se han identificado cinco clases de inmunoglobulina, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Las proteínas IgG, IgD e IgE son característicamente heterotetrámeros unidos mediante enlaces de tipo disulfuro constituidos por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Comúnmente, la IgM se encuentra como un pentámero de un tetrámero, mientras que la IgA tiene lugar como un dímero de un tetrámero.

La IgG comprende la clase principal, pues existe normalmente como la segunda proteína más abundante encontrada en el plasma. En seres humanos, la IgG consta de cuatro subclases denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Como se muestra en la figura 2, cada cadena pesada de inmunoglobulina posee una región constante que consta de dominios proteicos de región constante (C_{H1} , bisagra, C_{H2} y C_{H3}) que son invariables para una subclase dada. Las regiones constantes de las cadenas pesadas de la clase IgG se identifican con el símbolo griego γ . Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la subclase IgG1 contienen una región constante $\gamma 1$ en las cadenas pesadas.

El fragmento Fc, o dominio Fc, consta de las regiones bisagra y los dominios C_{H2} y C_{H3} de las cadenas pesadas unidos mediante enlaces de tipo disulfuro. En las proteínas de fusión de inmunoglobulina, los dominios Fc de la subclase IgG1 se usan habitualmente como el resto de inmunoglobulina, porque la IgG1 tiene la vida media en suero más larga de todas las proteínas séricas. Una vida media en suero prolongada puede ser una característica proteica deseable para los estudios animales y un posible uso terapéutico en seres humanos. Además, la subclase IgG1 posee la mayor capacidad de llevar a cabo funciones efectoras mediadas por anticuerpos. La función efectora principal que puede ser la más útil en una proteína de fusión de inmunoglobulina es la capacidad de un anticuerpo IgG1 para mediar la citotoxicidad celular dependiente de un anticuerpo. Por otro lado, esto podría ser una función no deseable para una proteína de fusión que funcione fundamentalmente como antagonista. Se han identificado varios de los residuos de aminoácido específicos que son importantes para una actividad mediada por la región constante de un anticuerpo en la subclase IgG1. La inclusión o la exclusión de estos aminoácidos específicos permite por tanto la inclusión o la exclusión de una actividad mediada por la región constante de una inmunoglobulina específica.

Se generaron seis versiones de un Fc de IgG1 humana modificado para crear proteínas de fusión de Fc. Se diseñó Fc-488 para la clonación conveniente de una proteína de fusión que contenía la región Fc $\gamma 1$ humana, y se construyó usando la región constante $\gamma 1$ de inmunoglobulina humana de tipo natural como molde. El temor a posibles efectos perjudiciales debido a un residuo de cisteína desapareado condujo a tomar la decisión de sustituir la cisteína (residuo de aminoácido 24 de SEC ID N.º 6), que normalmente se une mediante enlaces de tipo disulfuro con la región constante de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina, por un residuo de serina. Se introdujo otro cambio más en el codón que codifica la posición del índice EU 218 (residuo de aminoácido 22 de la SEC ID N.º 6) para introducir un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BglIII con el fin de facilitar futuras manipulaciones del ADN. Estos cambios fueron introducidos en el producto de la PCR codificado en cebadores para PCR. Debido a la ubicación del sitio de BglIII y para completar la región bisagra de Fc, se incorporaron los codones para las posiciones del índice EU 216 y 217 (residuos de aminoácido 20 y 21 de la SEC ID N.º 6) en las parejas secuenciales de la proteína de fusión.

Fc4, Fc5 y Fc6 contienen mutaciones para reducir las funciones efectoras mediadas por el Fc reduciendo la unión a Fc γ RI y la unión al complemento C1q. Fc4 contiene las mismas sustituciones de aminoácidos que fueron introducidas en Fc-488. Se introdujeron más sustituciones de aminoácido para reducir posibles funciones efectoras mediadas por Fc. Específicamente, se introdujeron tres sustituciones de aminoácidos para reducir la unión a Fc γ RI. Éstas son las sustituciones en las posiciones del índice EU 234, 235 y 237 (residuos de aminoácido 38, 39 y 41 de SEC ID N.º 6). Se ha observado que las sustituciones realizadas en estas posiciones han reducido la unión a Fc γ RI (Duncan *et al.*, *Nature* 332:563 (1988)). Estas sustituciones de aminoácido también pueden reducir la unión a Fc γ RIII, así como la unión a Fc γ RIII (Sondermann *et al.*, *Nature* 406:267 (2000); Wines *et al.*, *J. Immunol.* 164:5313 (2000)).

ES 2 334 772 T3

Varios grupos han descrito la relevancia de las posiciones del índice EU 330 y 331 (residuos de aminoácido 134 y 135 de la SEC ID N.º 6) en la unión al complemento C1q y la posterior fijación del complemento (Canfield y Morrison, *J. Exp. Med* 173:1483 (1991); Tao *et al.*, *J. Exp. Med.* 178:661 (1993)). Las sustituciones de los aminoácidos realizadas en estas posiciones fueron introducidas en Fc4 para reducir la fijación del complemento. El dominio CH3 de Fc4 es idéntico al encontrado en el correspondiente polipéptido de tipo natural, a excepción del codón de terminación, que fue cambiado de TGA a TAA para eliminar un posible sitio de metilación *dam* cuando se cultive el ADN clonado en cepas de *E. coli* más *dam*.

En Fc5, se volvió a mutar el residuo de arginina situado en la posición del índice EU 218 a una lisina, porque el esquema de clonación de *BgIII* no se usó en proteínas de fusión que contenían este determinado Fc. El resto de la secuencia de Fc5 coincide con la descripción anterior de Fc4.

Fc6 es idéntico a Fc5, a excepción de que el codón de lisina carboxi-terminal ha sido eliminado. La lisina C-terminal de inmunoglobulinas maduras es eliminada habitualmente de las inmunoglobulinas maduras tras la traducción antes de la secreción desde células B o es eliminada durante la circulación en suero. Por consiguiente, el residuo de lisina C-terminal no se encuentra comúnmente en anticuerpos circulantes. Como en los Fc4 y Fc5 anteriores, el codón de terminación de la secuencia de Fc6 fue cambiado a TAA.

Fc7 es idéntico al Fc de $\gamma 1$ de tipo natural, a excepción de una sustitución del aminoácido situado en la posición del índice EU 297 ubicada en el dominio CH2.

La posición del índice EU Asn-297 (residuo de aminoácido 101 de SEC ID N.º 6) es un sitio de unión de carbohidratos ligado a N. El carbohidrato ligado a N introduce una posible fuente de variabilidad en una proteína expresada recombinantemente, debido a las posibles variaciones de lote a lote de la estructura del hidrato de carbono. En un intento por eliminar esta posible variabilidad, se mutó Asn-297 a un residuo de glutamina para evitar la unión del hidrato de carbono ligado a N en esa posición de residuo. El hidrato de carbono del residuo 297 también está implicado en la unión de Fc a Fc γ RIII (Sondermann *et al.*, *Nature* 406:267 (2000)). Por lo tanto, la eliminación del hidrato de carbono debería disminuir la unión del Fc7 recombinante que contiene las proteínas de fusión con los Fc γ R en general. Como en el caso anterior, el codón de terminación de la secuencia de Fc7 fue mutado a TAA.

Fc8 es idéntico a la región $\gamma 1$ de la inmunoglobulina de tipo natural mostrada en la SEC ID N.º 6, a excepción de que el residuo de cisteína de la posición del índice EU 220 (residuo de aminoácido 24 de la SEC ID N.º 6) fue reemplazado por un residuo de serina. Esta mutación eliminó el residuo de cisteína que normalmente se une mediante enlaces de tipo disulfuro con la región constante de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina.

En la tabla 1, se describen constructos de TACI-Fc ilustrativos.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Constructos de proteínas de fusión de TACI-Fc ilustrativos	
Secuencia del TACI ^a	Versión de Fc
TACI ^b	Fc4
TACI ^b	Fc5
TACI ^b	Fcγ1
TACI (d107-154)	Fc5
TACI (R119Q)	Fc4
TACI (1-104)-BCMA (42-54) ^c	Fc5
TACI (d143-150)	Fc5
TACI (R142G, d143-150)	Fc5
TACI (R119G, Q121P, R122Q, S123A)	Fc5
TACI(R119G, R122Q)	Fc5
TACI (d1-28, V29M)	Fc6
TACI (d1-29)	Fc6
TACI (d1-29)	Fc5
TACI (d1-29, d107-154)	Fc5
TACI (d1-29, d111-154)	Fc5
TACI (d1-29, d120-154)	Fc5
^a La información sobre ubicaciones, mutaciones y eliminaciones de secuencias de aminoácidos se proporciona entre paréntesis con referencia a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2. ^b Incluye los residuos de aminoácido 1 a 154 de SEC ID N.º 2. ^c Este constructo incluye los residuos de aminoácido 1 a 104 de SEC ID N.º 2 (TACI) y los aminoácidos 42 a 54 de SEC ID N.º 27 (BCMA).	

Se produjeron las proteínas de TACI-Fc mediante células de ovario de hámster chino recombinantes, se aislaron y se analizaron usando un análisis de transferencia Western y un análisis de las secuencias de aminoácidos. Sorprendentemente, la eliminación de los 29 primeros aminoácidos del terminal N del polipéptido TACI dio como resultado un aumento de diez veces la producción de las proteínas de fusión de TACI-Fc mediante células de ovario de hámster chino. Esta eliminación también redujo la escisión de la región del tallo de longitud completa. Además, se suprimió la escisión en la región del tallo del TACI bien mediante el truncamiento de la región del tallo del TACI o mediante la sustitución de la región del tallo del TACI en otra secuencia de aminoácidos (p. ej., la secuencia de aminoácidos de la región del tallo del BCMA).

ES 2 334 772 T3

Según lo descrito en el ejemplo 4, los análisis funcionales de los constructos de TACI-Fc indican que las proteínas de fusión TACI (d1-29)-Fc5, TACI (d1-29, d107-154)-Fc5, TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 y TACI (d1-29, d120-154)-Fc5 tienen afinidades de unión similares por ZTNF24. Sin embargo, los constructos TACI (d1-29)-Fc5, TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 y TACI (d1-29, d120-154)-Fc5 parecen unirse más a ZTNF4 por mol de TACI-Fc que el constructo TACI (d1-29, d107-154)-Fc5. En función del uso deseado (es decir, terapéutico, de diagnóstico o de investigación), se pueden emplear bien proteínas de fusión de TACI-Fc de alta capacidad o de baja capacidad. Además, la combinación de proteínas de fusión de TACI-Fc de alta y baja capacidad permite la valoración de ZTNF2 o de ZTNF24.

La presente invención contempla proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina según lo definido en las reivindicaciones que comprenden un resto de receptor TACI constituido por los residuos de aminoácido 34 a 104 de la SEC ID N.º 2, 30 a 110 de la SEC ID N.º 2 ó 30 a 154 de la SEC ID N.º 2. La presente memoria describe proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina que comprenden un resto de receptor TACI constituido por los residuos de aminoácido 31 a 106 de la SEC ID N.º 2, 31 a 110 de la SEC ID N.º 2, 31 a 119 de la SEC ID N.º 2 ó 31 a 154 de la SEC ID N.º 2.

De manera más general, la presente memoria describe proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina en las que el resto de receptor TACI consta de un fragmento de los residuos de aminoácido 30 a 154 de SEC ID N.º 2 y en las que el resto de receptor TACI se une con al menos uno entre ZTNF2 o ZTNF4. Tales fragmentos comprenden una región de pseudo-repetición rica en cisteína y, opcionalmente, pueden incluir al menos uno entre un segmento N-terminal, que reside en una posición amino-terminal de la región de pseudo-repetición rica en cisteína, y un segmento del tallo, que reside en una posición carboxi-terminal con respecto a la región de pseudo-repetición rica en cisteína. Las regiones de pseudo-repetición ricas en cisteína incluyen polipéptidos que: (a) comprenden, al menos, uno entre los residuos de aminoácido 34 a 66 de la SEC ID N.º 2 y los residuos de aminoácido 71 a 104 de la SEC ID N.º 2; (b) comprenden tanto los residuos de aminoácido 34 a 66 de la SEC ID N.º 2 como los residuos de aminoácido 71 a 104 de la SEC ID N.º 2; o (c) comprenden los residuos de aminoácido 34 a 104 de la SEC ID N.º 2.

Los segmentos N-terminales incluyen los siguientes con referencia a la SEC ID N.º 2: el residuo de aminoácido 33; los residuos de aminoácido 32 a 33; los residuos de aminoácido 31 a 33; y los residuos de aminoácido 30 a 33. Los segmentos del tallo adecuados incluyen uno o más aminoácidos de los residuos de aminoácido 105 a 154 de la SEC ID N.º 2. Por ejemplo, el segmento del tallo puede constar de los siguientes con referencia a la SEC ID N.º 2: el residuo de aminoácido 105, los residuos de aminoácido 105 a 106, los residuos de aminoácido 105 a 107, los residuos de aminoácido 105 a 108, los residuos de aminoácido 105 a 109, los residuos de aminoácido 105 a 110, los residuos de aminoácido 105 a 111, los residuos de aminoácido 105 a 112, los residuos de aminoácido 105 a 113, los residuos de aminoácido 105 a 114, los residuos de aminoácido 105 a 115, los residuos de aminoácido 105 a 116, los residuos de aminoácido 105 a 117, los residuos de aminoácido 105 a 118, los residuos de aminoácido 105 a 119, los residuos de aminoácido 105 a 120, los residuos de aminoácido 105 a 121, los residuos de aminoácido 105 a 122, los residuos de aminoácido 105 a 123, los residuos de aminoácido 105 a 124, los residuos de aminoácido 105 a 125, los residuos de aminoácido 105 a 126, los residuos de aminoácido 105 a 127, los residuos de aminoácido 105 a 128, los residuos de aminoácido 105 a 129, los residuos de aminoácido 105 a 130, los residuos de aminoácido 105 a 131, los residuos de aminoácido 105 a 132, los residuos de aminoácido 105 a 133, los residuos de aminoácido 105 a 134, los residuos de aminoácido 105 a 135, los residuos de aminoácido 105 a 136, los residuos de aminoácido 105 a 137, los residuos de aminoácido 105 a 138, los residuos de aminoácido 105 a 139, los residuos de aminoácido 105 a 140, los residuos de aminoácido 105 a 141, los residuos de aminoácido 105 a 142, los residuos de aminoácido 105 a 143, los residuos de aminoácido 105 a 144, los residuos de aminoácido 105 a 145, los residuos de aminoácido 105 a 146, los residuos de aminoácido 105 a 147, los residuos de aminoácido 105 a 148, los residuos de aminoácido 105 a 149, los residuos de aminoácido 105 a 150, los residuos de aminoácido 105 a 151, los residuos de aminoácido 105 a 152, los residuos de aminoácido 105 a 153 y los residuos de aminoácido 105 a 154.

Otros segmentos del tallo adecuados incluyen uno o más aminoácidos de la región del tallo del BCMA (es decir, los residuos de aminoácido 42 a 54 de SEC ID N.º 27). Por ejemplo, el segmento del tallo puede constar de los siguientes con referencia a la SEC ID N.º 27: el residuo de aminoácido 42, los residuos de aminoácido 42 a 43, los residuos de aminoácido 42 a 44, los residuos de aminoácido 42 a 45, los residuos de aminoácido 42 a 46, los residuos de aminoácido 42 a 47, los residuos de aminoácido 42 a 48, los residuos de aminoácido 42 a 49, los residuos de aminoácido 42 a 50, los residuos de aminoácido 42 a 51, los residuos de aminoácido 42 a 52, los residuos de aminoácido 42 a 53 y los residuos de aminoácido 42 a 54.

De manera más general, el segmento del tallo puede constar de dos a 50 residuos de aminoácido.

El resto de inmunoglobulina de una proteína de fusión descrita en la presente memoria comprende, al menos, una región constante de una inmunoglobulina. Preferiblemente, el resto de inmunoglobulina representa un segmento de una inmunoglobulina humana. La secuencia de la inmunoglobulina humana puede ser una secuencia de aminoácidos de tipo natural o una secuencia de aminoácidos de tipo natural modificada que tenga, al menos, una de las mutaciones de aminoácidos tratadas anteriormente.

La secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina humana también puede variar del tipo natural teniendo una o más mutaciones características de un determinante alotípico conocido. La tabla 2 muestra los determinantes alotípicos de la región constante de la IgG γ 1 humana (Putman, "The Plasma Proteins", Vol. V, páginas 49 a 140 (Academic Press, Inc. 1957)). Las posiciones del índice EU 214, 356, 358 y 431 definen los alotipos de IgG γ 1 conocidos. La posición 214 está en el dominio C_{H1} de la región constante de la IgG γ 1 y, por tanto, no reside en la secuencia de Fc.

ES 2 334 772 T3

La secuencia de Fc de tipo natural de la SEC ID N.º 6 incluye los alotipos G1m(1) y G1m(2-). Sin embargo, se puede modificar el resto de Fc de una proteína TACI-Fc para que refleje cualquier combinación de estos alotipos.

TABLA 2

Determinantes alotípicos de la región constante de la inmunoglobulina γ 1 humana			
Alotipo	Residuo de aminoácido	Posición de los aminoácidos	
		Índice EU	SEC ID N.º 6
G1m(1)	Asp, Leu	356, 358	160, 162
G1m(1-)	Glu, Met	356, 358	160, 162
G1m(2)	Gly	431	235
G1m(2-)	Ala	431	235
G1m(3)	Arg	214	---
G1m(3-)	Lys	214	---

Los ejemplos de proteínas de TACI-Fc revelados en la presente memoria comprenden regiones constantes de la IgG1 humana. Sin embargo, los restos de inmunoglobulina adecuados también incluyen polipéptidos que comprenden, al menos, una región constante, tal como una región constante de una cadena pesada de cualquiera de las siguientes inmunoglobulinas: IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM. Ventajosamente, los restos de inmunoglobulina derivados de la IgG2 de tipo natural o de la IgG4 de tipo natural ofrecen una función efectora reducida en comparación con la IgG1 de tipo natural o la IgG3 de tipo natural. La presente memoria describe las proteínas de fusión que comprenden un resto de receptor TACI, según lo descrito anteriormente, y bien albúmina o β 2-macroglobulina.

Otro tipo de proteína de fusión de receptor que se une con ZTNF2 o ZTNF24 es una proteína de fusión de BCMA-inmunoglobulina. Se han realizado estudios con una proteína de fusión de BCMA-Fc4 en la que el resto de BCMA consta de los residuos de aminoácido 1 a 48 de la SEC ID N.º 27. Sorprendentemente, los estudios farmacocinéticos realizados en ratones revelaron que la proteína de fusión de BCMA-Fc4 resultó tener una vida media de aproximadamente 101 horas, mientras que una proteína TACI-Fc resultó tener una vida media de 25 horas. Por ende, puede ser preferible la administración de una proteína de fusión de BCMA-inmunoglobulina en ciertos entornos clínicos. Además, la combinación de las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina y de BCMA-inmunoglobulina puede ser ventajosa para tratar ciertas afecciones. Esta terapia de combinación se puede realizar mediante la administración de las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina y de BCMA-inmunoglobulina, o mediante la administración de heterodímeros de las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina y BCMA-inmunoglobulina.

Otro tipo de proteína de fusión de receptor que se une con ZTNF4 es una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende un dominio extracelular de un receptor denominado "Ztnfr12". Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de Ztnfr12 se proporcionan como la SEC ID N.º 59 y la SEC ID N.º 60, respectivamente. Los restos de receptor Ztnfr12 incluyen los polipéptidos que comprenden los residuos de aminoácido 1 a 69 de la SEC ID N.º 60 o los residuos de aminoácido 19 a 35 de la SEC ID N.º 60.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden tener la forma de polipéptidos monocatenarios, dímeros, trímeros o múltiples de dímeros o de trímeros. Los dímeros pueden ser homodímeros o heterodímeros, y los trímeros pueden ser homotrímeros o heterotrímeros. Los ejemplos de heterodímeros incluyen un polipéptido TACI-inmunoglobulina con un polipéptido de BCMA-inmunoglobulina, un polipéptido TACI-inmunoglobulina con un polipéptido de Ztnfr12-inmunoglobulina y un polipéptido de BCMA-inmunoglobulina con un polipéptido de Ztnfr12-inmunoglobulina. Los ejemplos de heterodímeros incluyen un polipéptido TACI-inmunoglobulina con dos polipéptidos de BCMA-inmunoglobulina, un polipéptido TACI-inmunoglobulina con dos polipéptidos de Ztnfr12-inmunoglobulina, un polipéptido de BCMA-inmunoglobulina con dos polipéptidos de Ztnfr12-inmunoglobulina, dos polipéptidos TACI-inmunoglobulina con un polipéptido de BCMA-inmunoglobulina, dos polipéptidos TACI-inmunoglobulina con un polipéptido de Ztnfr12-inmunoglobulina, dos polipéptidos de BCMA-inmunoglobulina con un polipéptido de Ztnfr12-inmunoglobulina y un trímero de un polipéptido TACI-inmunoglobulina, un polipéptido de BCMA-inmunoglobulina y un polipéptido de Ztnfr12-inmunoglobulina.

En tales proteínas de fusión, el resto de receptor TACI puede constar de la siguiente secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 2: los residuos de aminoácido 30 a 154. El resto de receptor BCMA puede comprender, al menos, una entre las siguientes secuencias de aminoácidos de SEC ID N.º 27: los residuos de aminoácido 1 a 48, los residuos de aminoácido 8 a 41 y los residuos de aminoácido 21 a 37. El resto de receptor Ztnfr12 puede comprender, al menos, una entre las siguientes secuencias de aminoácidos de SEC ID N.º 60: los residuos de aminoácido 1 a 69 y los residuos de aminoácido 19 a 35.

Se pueden producir proteínas de fusión usando los procedimientos de PCR usados para construir las moléculas de TACI-Fc ilustrativas que se describen en los ejemplos. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden usar otros enfoques estándar. Por ejemplo, se pueden obtener moléculas de ácido nucleico que codifiquen los polipéptidos TACI, BCMA, Ztnfr12 o inmunoglobulina rastreando bancos de ADNc humano o genotecas usando sondas de polinucleótido basadas en las secuencias reveladas en la presente memoria. Estas técnicas son estándar y están bien establecidas (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (eds.), “Short Protocols in Molecular Biology”, III Edición, páginas 4-1 a 4-6 (John Wiley & Sons 1995) (“Ausubel (1995)”); Wu *et al.*, “Methods in Gene Biotechnology”, páginas 33-41 (CRC Press, Inc. 1997) (“Wu (1997)”); Ausubel (1995) en las páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) en las páginas 307-327)).

Alternativamente, se pueden obtener moléculas para construir proteínas de fusión de inmunoglobulina sintetizando moléculas de ácido nucleico mediante el uso de oligonucleótidos largos que se ceban mutuamente y las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 8-8 a 8-9). Las técnicas establecidas que usan la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar moléculas de ADN de una longitud de, al menos, dos kilobases (Adang *et al.*, *Plant Molec. Biol.* 21:1131 (1993), Bambot *et al.*, “PCR Methods and Applications” 2:266 (1993), Dillon *et al.*, “Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes” en “Methods in Molecular Biology”, Vol. 15: “PCR Protocols: Current Methods and Applications”, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc. 1993) y Holowachuk *et al.*, *PCR Methods Appl.* 4:299 (1995)).

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también pueden ser sintetizadas con “máquinas de genes” usando protocolos tales como el procedimiento de la fosforamidita. Si se requiere ADN bicatenario sintetizado químicamente para una aplicación tal como la síntesis de un gen o de un fragmento de gen, entonces se forma cada cadena complementaria por separado. La producción de genes cortos (60 a 80 pares de bases) es sencilla técnicamente y se puede realizar sintetizando las cadenas complementarias y luego apareándolas. Para la producción de los genes más largos (>300 pares de bases), sin embargo, pueden ser necesarias estrategias especiales, porque la eficacia del acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis de ADN químico es casi del 100%. Para solucionar este problema, los genes sintéticos (bicatenarios) son ensamblados de forma modular a partir de fragmentos monocatenarios que son de 20 a 100 nucleótidos de longitud. Para más información sobre la síntesis de polinucleótidos, véase, por ejemplo, Glick y Pasternak, “Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA” (ASM Press 1994), Itakura *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984) y Climie *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 87:633 (1990).

4. Producción de polipéptidos TACI-inmunoglobulina

Los polipéptidos de la presente invención se pueden producir en células huésped recombinantes siguiendo técnicas convencionales. Para expresar una secuencia que codifica TACI-inmunoglobulina, se debe ligar operativamente una molécula de ácido nucleico que codifique el polipéptido con secuencias reguladoras que controlen la expresión de la transcripción en un vector de expresión y, luego, introducirla en una célula huésped. Además de las secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias reguladoras de la traducción y un gen marcador que sea adecuado para la selección de células que porten el vector de expresión.

Los vectores de expresión que son adecuados para la producción de una proteína foránea en células eucariotas contienen comúnmente (1) elementos de ADN procariota que codifican un origen de replicación bacteriano y un marcador de la resistencia a un antibiótico para proporcionar el crecimiento y la selección del vector de expresión en un huésped bacteriano; (2) elementos de ADN eucariota que controlan el inicio de la transcripción, tales como un promotor; y (3) elementos de ADN que controlan el procesamiento de los transcritos, tales como una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación.

Los vectores de expresión también pueden incluir secuencias de nucleótidos que codifiquen una secuencia secretora que dirija al polipéptido heterólogo hacia la ruta secretora de una célula huésped. Por ejemplo, un vector de expresión puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifique TACI-inmunoglobulina y una secuencia secretora derivada de cualquier gen secretado. Según lo tratado anteriormente, una secuencia señal adecuada es una secuencia señal tPA. La SEC ID N.º 25 proporciona un ejemplo de secuencia señal tPA. Otra secuencia señal adecuada es una secuencia señal de la V_H del 26-10 murino. El anticuerpo 26-10 murino es descrito, por ejemplo, por Near *et al.*, *Mol. Immunol.* 27:901 (1990). Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos ilustrativas de la secuencia señal de la V_H de 26-10 murino son proporcionadas por la SEC ID N.º 61 y la SEC ID N.º 65, respectivamente. La SEC ID N.º 62 revela la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de TACI-Fe5 que comprende una secuencia señal de la V_H de 26-10 murino.

Las proteínas TACI-inmunoglobulina de la presente invención pueden estar expresadas en células de mamífero. Los ejemplos de células huésped de mamífero adecuadas incluyen células de riñón de mono verde africano (Vero;

ES 2 334 772 T3

ATCC CRL 1587), células de riñón embrionario humano (293-HEK; ATCC CRL 1573), células de riñón de hámster neonato (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células de riñón canino (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin *et al.*, *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555, 1986)), células pituitarias de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas con el SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

Para un huésped mamífero, las señales reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden tener un origen vírico, tal como de adenovirus, virus del papiloma bovino, virus de simio o similares, en el que las señales reguladoras están asociadas con un determinado gen que tiene un nivel de expresión elevado. Las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción también se pueden obtener de genes de mamífero, tales como genes de actina, de colágeno, de miosina y de metalotioneína.

Las secuencias reguladoras de la transcripción incluyen una región promotora suficiente para dirigir el inicio de la síntesis de ARN. Los promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor del gen de la *metalotioneína I* de ratón (Harner *et al.*, *J. Molec. Appl. Genet.* 1:273 (1982)), el promotor *TK* del virus *Herpes* (McKnight, *Cell* 31:355 (1982)), el promotor temprano del SV40 (Benoit *et al.*, *Nature* 290:304 (1981)), el promotor del virus del sarcoma de Rous (Gorman *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 79:6777 (1982)), el promotor del citomegalovirus (Foecking *et al.*, *Gene* 45:101 (1980)) y el promotor del virus del tumor de mama de ratón (véase, en general, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en "Protein Engineering: Principles and Practice", Cleland *et al.* (eds.), páginas 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)). El promotor del virus del sarcoma mieloproliferativo y el potenciador del citomegalovirus humano proporcionan una combinación útil de un promotor y un potenciador.

Alternativamente, se puede usar un promotor procariota, tal como el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T3, para controlar la producción de proteínas TACI-inmunoglobulina en células de mamífero si el promotor procariota está regulado por un promotor eucariota (Zhou *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 10:4529 (1990) y Kaufman *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 19:4485 (1991)).

Se puede introducir un vector de expresión en células huésped usando una variedad de técnicas estándar que incluyen la transfección mediante fosfato de calcio, la transfección mediada por liposomas, la administración mediada por microproyectiles, la electroporación y similares. Las células transfectadas se pueden seleccionar y propagar para proporcionar células huésped recombinantes que comprendan el vector de expresión integrado establemente en el genoma de las células huésped. Las técnicas para introducir vectores en células eucariotas y las técnicas para seleccionar tales transformantes estables usando un marcador seleccionable dominante están descritas, por ejemplo, por Ausubel (1995) y por Murray (ed.), "Gene Transfer and Expression Protocols" (Humana Press 1991).

Por ejemplo, un marcador seleccionable adecuado es un gen que proporciona resistencia al antibiótico neomicina. En este caso, la selección se lleva a cabo en presencia de un fármaco del tipo de la neomicina, tal como G-418 o uno similar. También se pueden usar sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, procedimiento que se denomina "amplificación". La amplificación se lleva a cabo mediante el cultivo de transfectantes en presencia de un nivel bajo del agente selectivo y, luego, mediante el aumento de la cantidad del agente selectivo para seleccionar células que produzcan niveles elevados de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable amplificable adecuado es la dihidrofolato-reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. También se pueden usar otros genes de resistencia a otros fármacos (p. ej., de resistencia a la higromicina, de resistencia a múltiples fármacos, de la puomicina-acetiltransferasa). Alternativamente, se pueden usar marcadores que introduzcan un fenotipo modificado, tal como proteína verde fluorescente, o proteínas de la superficie celular, tales como CD4, CD8, MHC de clase I, fosfatasa alcalina de placenta, para diferenciar las células transfectadas de las células no transfectadas mediante procedimientos como la clasificación FACS o la tecnología de separación mediante perlas magnéticas.

También se pueden producir polipéptidos TACI-inmunoglobulina mediante células de mamífero cultivadas usando un sistema de administración vírico. Los ejemplos de virus útiles a tal efecto incluyen adenovirus, virus del herpes, virus *Vaccinia* y virus adenoasociados (AAV, *Adeno-Associated Virus*). El adenovirus, un virus de ADN bicatenario, es actualmente el vector de transferencia génica mejor estudiado para la administración de ácido nucleico heterólogo (para más información, véase Becker *et al.*, *Meth. Cell Biol.* 43:161 (1994) y Douglas y Curiel, *Science & Medicine* 4:44 (1997)). Las ventajas del sistema de adenovirus incluyen el alojamiento de insertos de ADN relativamente largos, la capacidad para crecer hasta títulos elevados, la capacidad para infectar una gran selección de tipos de células de mamífero y la flexibilidad que permite su uso con un gran número de vectores disponibles que contienen diferentes promotores.

Mediante la eliminación de partes del genoma del adenovirus, se pueden alojar insertos más largos (de hasta 7 kb) del ADN heterólogo. Estos insertos pueden ser incorporados en el ADN vírico mediante la unión directa o mediante la recombinación homóloga con un plásmido cotransfectado. Una opción es la de eliminar el gen *E1* esencial del vector vírico, lo que da como resultado la incapacidad para replicarse a no ser que el gen *E1* sea proporcionado por la célula huésped. Se pueden cultivar, por ejemplo, células 293 humanas infectadas con un vector de adenovirus (N.º ATCC CRL-1573, 45504, 45505) como células adherentes o en cultivo en suspensión a una densidad de células relativamente elevada para producir cantidades significativas de proteína (véase Garnier *et al.*, *Cytotechnol.* 15:145 (1994)).

ES 2 334 772 T3

Los expertos en la técnica pueden crear vectores de expresión adecuados para producir las proteínas de fusión descritas en la presente memoria con células de mamífero. El ejemplo 4 describe características de un vector de expresión. Como otro ejemplo, un vector de expresión puede comprender un casete de expresión bicistrónico que incluye una parte del potenciador del citomegalovirus humano, el promotor del virus del sarcoma mieloproliferativo, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión, los sitios de entrada ribosómicos internos del poliovirus, una secuencia de nucleótidos que codifica la dihidrofolato-reductasa murina, seguida por la secuencia de adición de poli(A) del SV40. La secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º 69 muestra un constructo de potenciador de citomegalovirus/promotor de la LTR del virus del sarcoma mieloproliferativo, en el que el potenciador del citomegalovirus se extiende del nucleótido 1 al 407. El promotor de la LTR del virus del sarcoma mieloproliferativo, con la región de control negativo ausente, se extiende del nucleótido 408 al nucleótido 884 de la SEC ID N.º 69. La SEC ID N.º 70 proporciona una secuencia de nucleótidos para el promotor de la LTR del virus del sarcoma mieloproliferativo sin la región de control negativo.

El ejemplo 1 describe un vector de expresión que comprende un promotor del citomegalovirus para dirigir la expresión del transgén de proteína recombinante, un intrón de una inmunoglobulina y una secuencia señal del activador tisular del plasminógeno. Un intrón de inmunoglobulina adecuado es un intrón de la V_H del 26-10 murino. La SEC ID N.º 66 proporciona una secuencia de nucleótidos ilustrativa de un intrón de la V_H del 26-10 murino. Un vector de expresión también puede incluir una región no traducida 5' (UTR, *Untranslated Region*) ubicada secuencia arriba de la secuencia de nucleótidos que codifique una proteína TACI-inmunoglobulina. Una 5'-UTR adecuada puede derivar del gen de la V_H del 26-10 murino. La SEC ID N.º 63 revela la secuencia de nucleótidos de una 5'-UTR de la V_H del 26-10 murino nativa útil, mientras que la SEC ID N.º 64 muestra la secuencia de nucleótidos de una 5'-UTR de la V_H del 26-10 murino, que ha sido optimizada en el extremo 3'.

A modo de ilustración, la SEC ID N.º 67 proporciona una secuencia de nucleótidos que incluye los siguientes elementos: una 5'-UTR de la V_H del 26-10 murino nativa (nucleótidos 1 a 51), una secuencia señal de la V_H del 26-10 murino (nucleótidos 52 a 97 y 182 a 192), un intrón de la V_H del 26-10 murino (nucleótidos 98 a 181), una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de TACI (nucleótidos 193 a 435) y una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de Fc5 (nucleótidos 436 a 1.131). La secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º 68 difiere de la SEC ID N.º 67 debido a la sustitución de una 5'-UTR de la V_H del 26-10 murino optimizada (nucleótidos 1 a 51) por la secuencia nativa.

Las proteínas TACI-inmunoglobulina también se pueden expresar en otras células eucariotas superiores, tales como células de ave, de hongo, de insecto, de levadura o vegetales. El sistema de baculovirus proporciona un medio eficaz para introducir genes clonados en células de insectos. Los vectores de expresión adecuados se basan en el virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) y contienen promotores conocidos, tales como el promotor 70 de la proteína del choque térmico (hsp) de *Drosophila*, el promotor del gen inmediato-temprano del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (ie-1) y el promotor temprano retardado de 39K, el promotor del baculovirus *p10* y el promotor de la metalotioneína de *Drosophila*. Un segundo procedimiento para fabricar baculovirus recombinantes utiliza un sistema basado en transposones descrito por Luckow (Luckow, *et al.*, *J. Virol.* 67:4566 (1993)). Este sistema, que utiliza vectores de transferencia, se comercializa en el equipo BAC-to-BAC (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, PFASTBAC (Life Technologies), que contiene un transposón Tn7 para mover el ADN que codifica el polipéptido TACI-inmunoglobulina al genoma del baculovirus mantenido en *E. coli* como un gran plásmido denominado "bácmido". Véase Hill-Perkins y Possee, *J. Gen. Virol.* 71:971 (1990), Bonning, *et al.*, *J. Gen. Virol.* 75:1551 (1994), y Chazenbalk y Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270:1543 (1995). Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en marco con ADN que codifica una etiqueta epitópica en el terminal C o N del polipéptido TACI-inmunoglobulina, por ejemplo, una etiqueta epitópica Glu-Glu (Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 82:7952 (1985)). Usando una técnica conocida en la técnica, se transforma un vector de transferencia que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TACI-inmunoglobulina en *E. coli* y se rastrea en busca de bácmidos que contengan un gen *lacZ* interrumpido indicador del baculovirus recombinante. El ADN de bácmido que contiene el genoma de baculovirus recombinante es entonces aislado usando técnicas comunes.

El vector PFASTBAC ilustrativo se puede modificar hasta un grado considerable. Por ejemplo, se puede retirar el promotor de la polihedrina y sustituirlo por el promotor de la proteína básica del baculovirus (también conocido como promotor *Pcor*, p6.9 o MP) que es expresado antes en la infección del baculovirus y del que se ha observado que es ventajoso para expresar proteínas secretadas (véase, por ejemplo, Hill-Perkins y Possee, *J. Gen. Virol.* 71:971 (1990), Bonning, *et al.*, *J. Gen. Virol.* 75:1551 (1994) y Chazenbalk y Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270:1543 (1995)). En tales constructos de vectores de transferencia, se puede usar una versión corta o larga del promotor de la proteína básica. Además, se pueden construir vectores de transferencia con las secuencias señal secretoras derivadas de proteínas de insectos. Por ejemplo, se puede usar en tales constructos una secuencia señal secretora de la Ecdisteroide glucosiltransferasa (EGT), la melitina de abeja de miel (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA) o el baculovirus gp67 (PharMingen; San Diego, CA).

El virus recombinante o bácmido se usa para transfectar células huésped. Las células huésped de insectos adecuadas incluyen líneas celulares derivadas de IPLB-*Sf*-21, una línea celular de ovario de pupas de *Spodoptera frugiperda*, tal como *Sf9* (ATCC CRL 1711), *Sf21AE* y *Sf21* (Invitrogen Corporation; San Diego, CA), así como células Schneider-2 de *Drosophila* y la línea celular HIGH FIDEO (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (Patente estadounidense n.º 5.300.435). Se pueden usar medios libres de suero comercialmente disponibles para desarrollar y mantener las

células. Los medios adecuados son IITM de Sf900 (Life Technologies) o 921TM de ESF (Expression Systems) para las células Sf9; y Ex-cello405TM (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveOTM (Life Technologies) para las células de *T. ni*. Cuando se usa virus recombinante, las células se desarrollan comúnmente de una densidad de inoculación de aproximadamente 2-5 x 10⁵ células hasta una densidad de 1-2 x 10⁶ células, momento en el cual se añade una reserva vírica recombinante a una multiplicidad de infección (Mdi) de 0,1 a 10, más comúnmente a casi 3.

Las técnicas establecidas para producir proteínas recombinantes en sistemas de baculovirus son proporcionadas por Bailey *et al.*, "Manipulation of Baculovirus Vectors" en *Methods in Molecular Biology*, Volumen 7: "Gene Transfer and Expression Protocols", Murray (ed.), páginas 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991), por Patel *et al.*, "The baculovirus expression system" en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, II edición, Glover *et al.* (eds.), páginas 205-244 (Oxford University Press 1995), por Ausubel (1995) en las páginas 16-37 a 16-57, por Richardson (ed.), "Baculovirus Expression Protocols" (The Humana Press, Inc. 1995) y por Lucknow, "Insect Cell Expression Technology" en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), páginas 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).

También se pueden usar células de hongos, incluyendo células de levaduras, para expresar los genes descritos en la presente memoria. Las especies de levaduras de particular interés a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolic*. Los promotores adecuados para la expresión en levaduras incluyen promotores de *GAL1* (galactosa), *PGK* (fosfoglicerato cinasa), *ADH* (alcohol deshidrogenasa), *AOX1* (alcohol oxidasa), *HIS4* (histidinol deshidrogenasa) y similares. Se han diseñado muchos vectores de clonación de levadura y se pueden obtener fácilmente. Es posible diseñar un vector para generar constructos que utilicen los elementos necesarios para llevar a cabo una recombinación homóloga en levadura (véase, por ejemplo, Raymond *et al.*, *BioTechniques* 26:134 (1999)). Por ejemplo, tal vector de expresión puede incluir secuencias de *URA3* y *CEN-ARS* (*Autonomously Replicating Sequence*, secuencia de replicación autónoma) necesarias para la selección y la replicación en *S. cerevisiae*. Otros vectores adecuados incluyen vectores basados en *YIp*, tales como *YIp5*, vectores basados en *YRp*, tales como *YRp17*, vectores basados en *YEp*, tales como *YEp13* y vectores basados en *YCp*, tales como *YCp19*. Los procedimientos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de estas células son revelados por, por ejemplo, Kawasaki, patente estadounidense n.º 4.599.311, Kawasaki *et al.*, patente estadounidense n.º 4.931.373, Brake, patente estadounidense n.º 4.870.008, Welch *et al.*, patente estadounidense n.º 5.037.743 y Murray *et al.*, patente estadounidense n.º 4.845.075. Las células transformadas son seleccionadas por el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente, la resistencia a un fármaco o la capacidad para desarrollarse en ausencia de un determinado nutriente (p. ej., leucina). Un sistema vectorial adecuado para su uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema vectorial *POT1* revelado por Kawasaki *et al.* (Patente estadounidense n.º 4.931.373), que permite la selección de células transformadas mediante su crecimiento en medios que contienen glucosa. Otros promotores y terminadores adecuados para su uso en levadura incluyen aquéllos de genes de enzimas glicolíticas (véase, p. ej., Kawasaki, patente estadounidense n.º 4.599.311, Kingsman *et al.*, patente estadounidense n.º 4.615.974 y Bitter, patente estadounidense n.º 4.977.092 y genes de la alcohol deshidrogenasa. Véanse también las patentes estadounidenses n.º 4.990.446, 5.063.154, 5.139.936 y 4.661.454.

En la técnica se conocen sistemas de transformación para otras levaduras, que incluyen *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolic*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*. Véase, por ejemplo, Gleeson *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* 132:3459 (1986) y Cregg, Patente estadounidense n.º 4.882.279. Se Pueden utilizar células de *Aspergillus* según los procedimientos de McKnight *et al.*, patente estadounidense n.º 4.935.349. Los procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum* son revelados por Sumino *et al.*, Patente estadounidense n.º 5.162.228. Lambowitz, patente estadounidense n.º 4.486.533, revela procedimientos para transformar *Neurospora*.

Por ejemplo, el uso de *Pichia methanolic* como huésped para la producción de proteínas recombinantes es revelado por Raymond, patente estadounidense 5.716.808, Raymond, patente estadounidense n.º 5.736.383, Raymond *et al.*, *Yeast* 14:11-23 (1998) y en las publicaciones internacionales n.º WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Las moléculas de ADN para su uso en la transformación de *P. methanolic* se prepararán comúnmente como plásmidos circulares bicatenario, que serán preferiblemente linealizados antes de su transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolic*, el promotor y el terminador del plásmido pueden ser los del gen de *P. methanolic*, tales como el gen de utilización del alcohol de *P. methanolic* (*AUG1* o *AUG2*). Otros promotores útiles incluyen aquéllos de los genes de la dihidroxiacetona sintasa (*DHAS*), de la formiato deshidrogenasa (*FMD*) y de la catalasa (*CAT*). Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma del huésped, es preferible tener el segmento de expresión entero del plásmido flanqueado por ambos extremos por las secuencias de ADN del huésped. Un marcador seleccionable adecuado para su uso en *Pichia methanolic* es un gen *ADE2* de *P. methanolic*, que codifica la fosforibosil-5-aminoimidazol carboxilasa (*AIRC*; EC 4.1.1.21) y que permite el crecimiento de las células huésped de *ade2* en ausencia de adenina. Para los procedimientos industriales a gran escala en los que es deseable minimizar el uso del metanol, se pueden usar células huésped en las que se hayan eliminado ambos genes de utilización del metanol (*AUG1* y *AUG2*). Para la producción de proteínas secretadas, las células huésped pueden ser deficientes en genes de proteasa vacuolar (*PÉP4* y *PRB1*). La electroporación se usa para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un polipéptido de interés en células de *P. methanolic*. Las células de *P. methanolic* se pueden transformar mediante electroporación usando un campo eléctrico pulsado decreciente exponencialmente que tenga una fuerza de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferiblemente de aproximadamente 3,75 kV/cm y una constante de tiempo (t) de 1 a 40 milisegundos, lo más preferible, de aproximadamente 20 milisegundos.

También se pueden introducir vectores de expresión en protoplastos vegetales, tejidos vegetales intactos o células vegetales aisladas. Los procedimientos para introducir vectores de expresión en tejido vegetal incluyen la infección directa o el cocultivo del tejido vegetal con *Agrobacterium tumefaciens*, la administración mediada con microproyectiles, la inyección de ADN, la electroporación y similares. Véase, por ejemplo, Horsch *et al.*, *Science* 227:1229 (1985), Klein *et al.*, *Biotechnology* 10:268 (1992) y Miki *et al.*, “Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants” en *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick *et al.* (eds.), páginas 67-88 (CRC Press, 1993).

Alternativamente, las proteínas TACI-inmunoglobulina pueden ser producidas en células huésped procariotas. Los promotores adecuados que se pueden usar para producir polipéptidos TACI-inmunoglobulina en un huésped procariota son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen promotores capaces de reconocer las polimerasas de T4, T3, Sp6 y T7, los promotores P_R y P_L del bacteriófago Lambda, los promotores *trp*, *recA*, de choque térmico, *lacUV5*, *tac*, *lpp-lacSpr*, *phoA* y *lacZ* de *E. coli*, los promotores de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, los promotores de *Streptomyces*, el promotor *int* del bacteriófago Lambda, el promotor *bla* de pBR322 y el promotor CAT del gen de la *cloranfenicol acetilo transferasa*. Los promotores procariotas han sido revisados por Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1:277 (1987), Watson *et al.*, “Molecular Biology of the Gene”, IV Ed. (Benjamin Cummins 1987) y por Ausubel *et al.* (1995).

Los huéspedes procariotas adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las cepas de *E. coli* adecuadas incluyen BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21 (DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF', DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451 y ER1647 (véase, por ejemplo, Brown (ed.), “Molecular Biology Labfax” (Academic Press 1991)). Las cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* incluyen BR151, YB886, MI119, MI120 y B170 (véase, por ejemplo, Hardy, “Bacillus Cloning Methods” en *DNA Cloning: A Practical Approach*, Glover (ed.) (IRL Press 1985)).

Cuando se expresa una proteína TACI-inmunoglobulina en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede ser retenido en el citoplasma, comúnmente, como gránulos insolubles, o puede ser dirigido al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células son lisadas y los gránulos son recubiertos y desnaturizados usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. Entonces se puede volver a plegar el polipéptido desnaturizado y dimerizarlo diluyendo el desnaturizante, tal como mediante diálisis frente a una solución de urea y una combinación de glutatona reducida y oxidada, seguida por la diálisis frente a una solución salina tamponada. En el último caso, es posible recuperar el polipéptido del espacio periplásmico en forma soluble y funcional ejerciendo un efecto sobre las células (mediante, por ejemplo, un tratamiento de ultrasonidos o un choque osmótico) para liberar los contenidos del espacio periplásmico y recuperar la proteína, evitando así la necesidad de la desnaturización y el replegamiento.

Los procedimientos para expresar proteínas en huéspedes procariotas son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Williams *et al.*, “Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies” en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, II edición, Glover *et al.* (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995), Ward *et al.*, “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies” en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995) y Georgiou, “Expression of Proteins in Bacteria” en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), página 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Ausubel (1995) proporciona procedimientos estándar para introducir vectores de expresión en células bacterianas, de levadura, de insecto y vegetales.

Etcheverry, “Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture” en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), páginas 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996) proporcionan procedimientos generales para expresar y recuperar proteína foránea producida por un sistema celular de mamífero. Por ejemplo, Grisshammer *et al.*, “Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells” en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, II edición, Glover *et al.* (eds.), páginas 59-92 (Oxford University Press 1995) proporcionan técnicas estándar para recuperar proteína producida por un sistema bacteriano. Richardson (ed.), “Baculovirus Expression Protocols” (The Humana Press, Inc. 1995) describe procedimientos establecidos para aislar proteínas recombinantes de un sistema de baculovirus.

Como alternativa, los polipéptidos de la presente invención se pueden sintetizar mediante la síntesis exclusiva en fase sólida, los procedimientos parciales en fase sólida, la condensación de fragmentos o la síntesis clásica de soluciones. Estos procedimientos de síntesis son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1963), Stewart *et al.*, “Solid Phase Peptide Synthesis” (II edición), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer y Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3:3 (1986), Atherton *et al.*, “Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach” (IRL Press 1989), Fields y Colowick, “Solid-Phase Peptide Synthesis” *Methods in Enzymology* Volumen 289 (Academic Press 1997) y Lloyd-Williams *et al.*, “Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins” (CRC Press, Inc. 1997)). Las variaciones en las estrategias de síntesis química total, tales como “la unión química nativa” y la “unión de proteínas expresadas” también son estándar (véase, por ejemplo, Dawson *et al.*, *Science* 266:776 (1994), Hackeng *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 94:7845 (1997), Dawson, *Methods Enzymol.* 287: 34 (1997), Muir *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 95:6705 (1998) y Severinov y Muir, *J. Biol. Chem.* 273:16205 (1998)).

5. Análisis para proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina

Es posible examinar la función de las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina usando una variedad de enfoques para medir la capacidad de las proteínas de fusión para unirse con ZTNF4 o con ZTNF2. A modo ilustrativo, el ejemplo 4 proporciona procedimientos para medir la afinidad y la capacidad de unión con ZTNF4.

Alternativamente, las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina pueden ser caracterizadas por la capacidad para inhibir la estimulación de células B humanas por ZTNF4 soluble, según lo descrito por Gross *et al.*, publicación internacional n.º WO00/40716. En síntesis, se aíslan células B humanas de células mononucleares de sangre periférica usando perlas magnéticas de CD19 y el sistema de separación magnética VarioMacs (Miltenyi Biotec Auburn, CA) según las instrucciones del fabricante. Se mezclan células B purificadas con ZTNF4 soluble (25 ng/ml) e IL-4 humana recombinante (10 ng/ml, Pharmingen) y se colocan las células en placas de 96 pocillos de fondo redondo a 1×10^5 células por pocillo.

Las proteínas TACI-inmunoglobulina solubles se pueden diluir de aproximadamente $5 \mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 6 ng/ml , e incubarlas con las células B durante cinco días, emitiendo pulsaciones durante una noche el día cuatro con $1 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina por pocillo. Como control, también se puede incubar proteína TACI-inmunoglobulina con células B e IL-4 sin ZTNF4. Las placas se cosechan usando un cosechador de placas de Packard y se realiza el recuento usando un lector de Packard.

Se usó este enfoque general para examinar tres proteínas de fusión de TACI-Fc. Aunque todas las proteínas de fusión inhibieron la proliferación de células B, los constructos TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 y TACI (d1-29, d120-154)-Fc5 fueron más potentes que TACI (d1-29, d107-154)-Fc5.

Hay modelos animales bien establecidos disponibles para analizar la eficacia *in vivo* de las proteínas TACI-inmunoglobulina en ciertos estados patológicos. Por ejemplo, se pueden analizar las proteínas TACI-inmunoglobulina en un número de modelos animales de enfermedad autoinmune, tales como cepas congénitas de ratones MRL-*lpr/lpr* o NZB x NZW F1, que sirven como modelo del LES (lupus eritematoso sistémico). Tales modelos animales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Cohen y Miller (Eds.), "Autoimmune Disease Models: A Guidebook" (Academic Press, Inc. 1994).

La descendencia de un cruce entre ratones negros de Nueva Zelanda (NZB) y ratones blancos de Nueva Zelanda (NZW) desarrolla una forma espontánea de LES que se asemeja mucho al LES en seres humanos. La descendencia de los ratones, conocida como NZBW, comienza a desarrollar auto-anticuerpos IgM frente a las células T a un mes de edad, y de los cinco a los siete meses de edad, los auto-anticuerpos frente al ADN son la inmunoglobulina dominante. La hiperactividad de las células B policlonales conduce a la sobre-producción de los auto-anticuerpos. La sedimentación de estos auto-anticuerpos, particularmente, de aquéllos dirigidos frente al ADN monocatenario, está asociada con el desarrollo de la glomerulonefritis, que se manifiesta clínicamente como proteinuria, azotemia y muerte a partir de una insuficiencia renal.

La insuficiencia de riñón es la causa principal de mortalidad en los ratones afectados de LES espontáneo y en la cepa NZBW, este procedimiento es crónico y obliterativo. La enfermedad es más rápida y grave en hembras que en machos, con una supervivencia media de sólo 245 días en comparación con los 406 días para los machos. Mientras que muchos de los ratones hembra serán sintomáticos (proteinuria) de los siete a los nueve meses de edad, algunos pueden ser mucho más jóvenes o más viejos cuando desarrollen los síntomas. La nefritis inmune mortal observada en los ratones NZBW es muy similar a la glomerulonefritis observada en el LES humano, lo que hace este modelo murino espontáneo muy atractivo para analizar los posibles agentes terapéuticos para el LES (Putterman y Naparstek, "Murine Models of Spontaneous Systemic Lupus Erythematosus" en *Autoimmune Disease Models: A Guidebook*, páginas 217-234 (Academic Press, Inc., 1994); Mohan *et al.*, *J. Immunol.* 154:1470 (1995); y Daikh *et al.*, *J. Immunol.* 159:3104 (1997)).

Según lo descrito por Gross *et al.*, publicación internacional n.º WO00/40716, se pueden administrar las proteínas TACI-inmunoglobulina a ratones NZBW para controlar su efecto supresor sobre las células B durante un período de cinco semanas cuando, como media, se cree que la producción de auto-anticuerpos frente a las células B está a niveles elevados en los ratones NZBW. En síntesis, se pueden dividir 100 ratones (NZB x NZW) F_1 hembra de 8 semanas de edad en seis grupos de 15 ratones. Antes del tratamiento, se analiza la proteína en orina de los ratones una vez al mes y se extrae sangre para CBC y el banco de suero. El suero se puede rastrear en cuanto a la presencia de auto-anticuerpos. Debido a que la proteinuria es el signo distintivo de la glomerulonefritis, se controlan los niveles de proteína en orina con una varilla medidora a intervalos regulares en el transcurso del estudio. El tratamiento puede comenzar cuando los ratones son de una edad de aproximadamente cinco meses. Los ratones reciben inyecciones intraperitoneales de sólo de vehículo (solución salina tamponada con fosfato) o de TACI-inmunoglobulina humana (proteína control) o de proteína TACI-inmunoglobulina (p. ej., de 20 a $100 \mu\text{g}$ de proteína de prueba por dosis) tres veces a la semana durante cinco semanas.

La sangre se recoge dos veces durante el tratamiento y será recogida al menos dos veces después del tratamiento. Se determinan los valores de la varilla medidora de orina para la proteinuria y los pesos corporales cada dos semanas tras comenzar el tratamiento. Se recogen sangre, el valor de la varilla medidora de orina y el peso corporal en el momento de la eutanasia. Se dividen el bazo y el timo para un análisis de clasificación celular activada por fluorescencia y

una histología. También se recogen glándulas salivales submandibulares, cadena de nódulos linfáticos mesentéricos, lóbulo de hígado con vesícula biliar, intestino ciego y grueso, estómago, intestino delgado, páncreas, riñón derecho, glándula suprarrenal, lengua con tráquea y esófago, corazón y pulmones para la histología.

5 Los modelos murinos para la encefalomiелitis alérgica experimental se han usado como herramienta para investigar tanto los mecanismos de las enfermedades mediadas por el sistema inmunológico como los procedimientos de una posible intervención terapéutica. El modelo se asemeja a la esclerosis múltiple humana y produce una desmielinización como resultado de la activación de células T a neuroproteínas tales como la proteína básica mielina o la proteína proteolipídica. La inoculación con antígeno conduce a la inducción de CD4+, células T restringidas al MHC de clase II (Th1). Los cambios en el protocolo para la encefalomiелitis alérgica experimental pueden producir variantes agudas, 10 recidivas crónicas o de transferencia pasiva del modelo (Weinberg *et al.*, *J. Immunol.* 162:1818 (1999); Mijaba *et al.*, *Cell. Immunol.* 186:94 (1999); y Glabinski, *Meth. Enzym.* 288:182 (1997)).

Gross *et al.*, publicación internacional n.º WO00/40716, describen un enfoque para evaluar la eficacia de las proteínas TACI-inmunoglobulina en la mejoría de los síntomas asociados con la encefalomiелitis alérgica experimental. 15 En síntesis, se administra una inyección subcutánea a 25 ratones PLxSJL F1 hembra (12 semanas de edad) de 125 µg/ratón de antígeno (proteína proteolipídica de mielina, PLP, residuos 139-151), formulada en adyuvante completo de Freund. Se dividen los ratones en cinco grupos de cinco ratones. Se administran inyecciones intraperitoneales de toxina pertussis (400 ng) el día 0 y 2. Se administra a los grupos una dosis x 1, x 10 y x 100 de proteína TACI-inmunoglobulina, un grupo sólo recibirá vehículo y un grupo no recibirá tratamiento. La terapia de prevención comienza el día 0, la terapia de intervención comienza el día 7 o al aparecer los signos clínicos. Los signos de la enfermedad, la pérdida de peso y la parálisis, se manifiestan a los aproximadamente 10 a 14 días y duran aproximadamente una semana. Se analizan diariamente los animales recogiendo los pesos corporales y asignando una puntuación clínica correspondiente al grado de sus síntomas. Los signos clínicos de la encefalomiелitis alérgica experimental aparecen a 25 los 10 a 14 días de la inoculación y duran aproximadamente una semana. Al finalizar el estudio, se sacrifican todos los animales mediante sobredosis de gas y se les hace una necropsia. Se recogen el cerebro y la columna vertebral para la histología o se congelan para el análisis del ARNm. Se representan el peso corporal y los datos de puntuación clínica por individuo y por grupo.

30 En el modelo de artritis inducida por colágeno, los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica, que se asemeja mucho a la artritis reumatoide humana. Como la artritis inducida por colágeno comparte características inmunológicas y patológicas similares con la artritis reumatoide, éste se convierte en un modelo ideal para rastrear los posibles compuestos anti-inflamatorios humanos. Otra ventaja del uso del modelo de artritis inducida por colágeno es que los mecanismos de patogénesis son conocidos. Se han identificado los epítopos de células T y B en el colágeno de tipo 35 II, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpo frente al colágeno) e inflamatorios (citocinas, quimiocinas y enzimas degradantes de la matriz), y se pueden usar para medir la eficacia de los compuestos de prueba en los modelos (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407 (1999); Williams *et al.*, *Immunol.* 89:9784 (1992); Myers *et al.*, *Life Sci.* 61:1861 (1997); y Wang *et al.*, *Immunol.* 92:8955 (1995)).

40 Gross *et al.*, publicación internacional n.º WO00/40716, describen un procedimiento para evaluar la eficacia de las proteínas TACI-inmunoglobulina en la mejoría de los síntomas asociados con la artritis inducida por colágeno. En síntesis, se dividen ratones DBA/1J macho de ocho semanas de edad (Jackson Labs) en grupos de cinco ratones/grupo y se les administran dos inyecciones subcutáneas de 50 a 100 µl de 1 mg/ml de colágeno (de pollo o de origen bovino) a intervalos de tres semanas. Un control no recibe inyecciones de colágeno. La primera inyección está formulada 45 en adyuvante completo de Freund y la segunda inyección está formulada en adyuvante incompleto de Freund. Se administra la proteína TACI-inmunoglobulina profilácticamente en o antes de la segunda inyección, o después de que el animal desarrolle una puntuación clínica de dos o más que dure al menos 24 horas. Los animales comienzan a mostrar síntomas de artritis tras la segunda inyección de colágeno, habitualmente, a las dos a tres semanas. Por ejemplo, se pueden administrar TACI-Fc, una proteína control, IgFc humana o solución salina tamponada con fosfato (vehículo) profilácticamente comenzando siete días antes de la segunda inyección (día -7). Las proteínas se pueden 50 administrar a 100 µg, tres veces a la semana como una inyección intraperitoneal de 200 µl, y continuando durante cuatro semanas.

En el modelo de artritis inducida por colágeno, se evalúa el grado de la enfermedad en cada pata usando un calibrador para medir el grosor de la pata y asignando una puntuación clínica a cada pata. Por ejemplo, una puntuación clínica 55 de "0" indica un ratón normal, una puntuación de "1" indica que hay uno o más dedos inflamados, una puntuación de "2" indica una inflamación suave de la pata, una puntuación de "3" indica una inflamación moderada de la pata y una puntuación de "4" indica una inflamación grave de la pata. Se sacrifican los animales una vez que la enfermedad se haya establecido durante un período establecido de tiempo, habitualmente, de siete días. Se extraen las patas para su 60 histología o análisis del ARNm, y se extrae suero para los análisis de inmunoglobulina y citocina.

La miastenia grave es otra enfermedad autoinmune para la que hay modelos murinos disponibles. La miastenia grave es un trastorno de transmisión neuromuscular que implica la producción de auto-anticuerpos dirigidos frente al receptor de la acetilcolina nicotínica. Esta enfermedad es adquirida o heredada con características clínicas que incluyen 65 una debilidad anormal y una fatiga al realizar ejercicio.

Se ha establecido un modelo murino de miastenia grave. (Christadoss *et al.*, "Establishment of a Mouse Model of Myasthenia gravis Which Mimics Human Myasthenia gravis Pathogenesis for Immune Intervention" en *Immunobio-*

logy of *Proteins and Peptides VIII*, Atassi y Bixler (Eds.), páginas 195-199 (1995)). La miastenia grave autoinmune experimental es una enfermedad mediada por anticuerpos caracterizada por la presencia de anticuerpos frente al receptor de la acetilcolina. Estos anticuerpos destruyen el receptor conduciendo a impulsos eléctricos neuromusculares defectuosos, dando como resultado una debilidad muscular. En el modelo de la miastenia grave autoinmune experimental, se inmunizan los ratones con el receptor de la acetilcolina nicotínica. Los signos clínicos de la miastenia grave se hacen evidentes semanas después de la segunda inmunización. La miastenia grave autoinmune experimental se evalúa mediante varios procedimientos que incluyen la medición de los niveles en suero de los anticuerpos frente al receptor de la acetilcolina mediante radioinmunoanálisis (Christadoss y Dauphinee, *J. Immunol.* 136:2437 (1986); Lindstrom *et al.*, *Methods Enzymol.* 74:432 (1981)), la medición del receptor de la acetilcolina muscular o la electromiografía (Coligan *et al.* (Eds.), *Protocols in Immunology*. Vol.3, página 15.8.1 (John Wiley & Sons, 1997)).

Se puede determinar el efecto de TACI-inmunoglobulina sobre la miastenia grave autoinmune experimental mediante la administración de proteínas de fusión cuando la miastenia grave clínica está en curso en ratones B6. Por ejemplo, se inmunizan 100 ratones B6 con 20 μg de receptor de la acetilcolina en adyuvante completo de Freund los días 0 y 30. Aproximadamente del 40 al 60% de los ratones desarrollará una miastenia grave clínica moderada (grado 2) a severa (grado 3) tras volver a inmunizar con receptor de acetilcolina. Se dividen los ratones con enfermedad clínica de grado 2 y 3 en tres grupos (con grados iguales de debilidad) y se pesan (los ratones con debilidad también pierden peso, pues tienen dificultades en consumir alimento y agua) y se les extrae suero (para el nivel de isotipos y anticuerpos frente al receptor de la acetilcolina previos al tratamiento). Al grupo A se le inyecta I.P. solución salina tamponada con fosfato, al grupo B se le inyecta intraperitonealmente IgG-Fc humana como proteína control (100 μg) y al grupo C se le inyectan 100 μg de TACI-Fc tres veces a la semana durante cuatro semanas. Se rastrean los ratones en cuanto a la debilidad muscular clínica dos veces a la semana, y se pesan y se extrae suero a los 15 y 30 días del comienzo del tratamiento. Se recoge sangre entera el día 15 para determinar la proporción entre células T/B mediante un análisis de clasificación celular activada mediante fluorescencia usando los marcadores B220 y CD5. Se sacrifican los ratones supervivientes a los 30 a 45 días del inicio del tratamiento y se congelan los cuerpos de los animales muertos para una extracción posterior del receptor de la acetilcolina muscular para determinar la pérdida de receptor de acetilcolina muscular, la patología principal de la miastenia grave (véase, por ejemplo, Coligan *et al.* (Eds.), *Protocols in Immunology*. Vol. 3, página 15.8.1 (John Wiley & Sons, 1997)).

Los anticuerpos en suero frente al receptor de la acetilcolina muscular de los ratones se pueden determinar mediante un radioinmunoanálisis establecido, y los isotipos de los anticuerpos frente al receptor de la acetilcolina (IgM, IgG1, IgG2b y IgG2c) se miden mediante ELISA. Tales procedimientos son conocidos. Se determinan los efectos de TACI-inmunoglobulina sobre la miastenia grave clínica en curso, el nivel de anticuerpos e isotipos frente al receptor de la acetilcolina y la pérdida de receptor de la acetilcolina muscular.

Se pueden inmunizar aproximadamente 100 ratones con 20 μg de receptor de la acetilcolina en adyuvante completo de Freund los días 0 y 30. Se dividen los ratones con miastenia grave clínica en cuatro grupos. Al grupo A se le inyectan intraperitonealmente 100 μg de Fc control, al grupo B se le inyectan 20 μg de Fc control, al grupo C se le inyectan 100 μg de TACI-Fc y al grupo D se le inyectan 20 μg de TACI-Fc tres veces a la semana durante cuatro semanas. Se pesan los ratones y se les extrae suero antes y a los 15 y 30 días del inicio del tratamiento. Se analiza el suero en cuanto al anticuerpo y los isotipos frente al receptor de la acetilcolina según lo descrito anteriormente. También se puede medir la pérdida de receptor de la acetilcolina muscular.

Los expertos en la técnica pueden determinar otros análisis adecuados de las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina.

6. Producción de conjugados de TACI-inmunoglobulina

La presente memoria describe composiciones de TACI-inmunoglobulina modificadas químicamente en las que un polipéptido TACI-inmunoglobulina está ligado con un polímero. Comúnmente, el polímero es hidrosoluble, tal que el conjugado de TACI-inmunoglobulina no precipite en un medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que haya sido modificado para tener un solo grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación. De este modo, se puede controlar el grado de polimerización. Un ejemplo de aldehído reactivo es el propionaldehído de polietilenglicol o monoalcoxilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ o derivados de ariloxilo del mismo (véase, por ejemplo, Harries, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Además, se puede usar una mezcla de polímeros para producir conjugados de TACI-inmunoglobulina.

Los conjugados de TACI-inmunoglobulina usados para una terapia pueden comprender restos poliméricos hidrosolubles farmacéuticamente aceptables. Los polímeros hidrosolubles adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-alcoxi($\text{C}_1\text{-C}_{10}$)-PEG, ariloxi-PEG, poli(N-vinilpirrolidón)PEG, tresil-monometoxi-PEG, propionaldehído de PEG, bis-succinimidil-carbonato-PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (p. ej., glicerol), alcohol polivinílico, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos. Los PEG adecuados pueden tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluyendo, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un conjugado de TACI-inmunoglobulina también puede comprender una mezcla de tales polímeros hidrosolubles.

Un ejemplo de un conjugado de TACI-inmunoglobulina comprende un resto de TACI-inmunoglobulina y un resto de óxido de polialquilo unido al terminal N de TACI-inmunoglobulina. El PEG es un óxido de polialquilo adecuado. A modo ilustrativo, el TACI-inmunoglobulina se puede modificar con PEG, procedimiento conocido como "PEGilación". La PEGilación de TACI-inmunoglobulina se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316, Delgado *et al.*, "Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems" 9:249 (1992), Duncan y Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27:290 (1994) y Francis *et al.*, *Int J Hematol* 68:1 (1998)). Por ejemplo, se puede realizar la PEGilación mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. En un enfoque alternativo, se forman conjugados de TACI-inmunoglobulina mediante la condensación de PEG activado, en el que se ha reemplazado un grupo amino o hidroxilo terminal del PEG por un ligador activado (véase, por ejemplo, Karasiewicz *et al.*, patente estadounidense n.º 5.382.657).

La PEGilación mediante acilación requiere, por lo común, hacer reaccionar un derivado de éster activo de PEG con un polipéptido TACI-inmunoglobulina. Un ejemplo de un éster de PEG activado es el PEG esterificado en N-hidroxisuccinimida. Como se usa en la presente memoria, el término "acilación" incluye los siguientes tipos de enlaces entre TACI-inmunoglobulina y un polímero hidrosoluble: amida, carbamato, uretano y similares. Los procedimientos para preparar TACI-inmunoglobulina PEGilado mediante acilación comprenderán comúnmente las etapas de (a) hacer reaccionar un polipéptido TACI-inmunoglobulina con PEG (tal como un éster reactivo de un derivado de aldehído de PEG) en condiciones mediante las cuales uno o más grupos de PEG se unan con TACI-inmunoglobulina y (b) obtener el o los productos de reacción. Generalmente, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación serán determinadas en base a parámetros conocidos y según los resultados que se deseen obtener. Por ejemplo, cuanto mayor sea la proporción entre PEG:TACI-inmunoglobulina, mayor será el porcentaje de producto de TACI-inmunoglobulina poliPEGilado.

El producto de la PEGilación mediante acilación es, comúnmente, un producto de TACI-inmunoglobulina poliPEGilado, en el que los grupos ϵ -amino de la lisina están PEGilados mediante un grupo de unión acilo. Un ejemplo de enlace conector es una amida. Comúnmente, el TACI-inmunoglobulina resultante estará, al menos, un 95% mono-, di- o tri-pegilado, aunque se pueden formar algunas especies con grados más elevados de PEGilación en función de las condiciones de reacción. Es posible separar la especie PEGilada de los polipéptidos TACI-inmunoglobulina sin conjugar usando procedimientos de purificación estándar, tales como diálisis, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares.

La PEGilación mediante alquilación implica generalmente hacer reaccionar un derivado de aldehído terminal del PEG con TACI-inmunoglobulina en presencia de un agente reductor. Los grupos de PEG se pueden unir al polipéptido mediante un grupo $-\text{CH}_2\text{-NH}$.

La derivación mediante alquilación reductora para generar un producto monoPEGilado aprovecha la reactividad diferencial de los diferentes tipos de grupos amino primarios disponibles para la derivación. Comúnmente, la reacción se lleva a cabo a un pH que permite aprovechar las diferencias de pKa entre los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y el grupo α -amino del residuo N-terminal de la proteína. Mediante tal derivación selectiva, se controla la unión de un polímero hidrosoluble que contiene un grupo reactivo, tal como un aldehído, con una proteína. La conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el terminal N de la proteína sin una modificación significativa de otros grupos reactivos tales como los grupos amino de las cadenas laterales de los residuos de lisina. La presente invención proporciona una preparación sustancialmente homogénea de conjugados monopoliméricos de TACI-inmunoglobulina.

La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de moléculas de conjugado de TACI-inmunoglobulina monopolimérico puede comprender las etapas de: (a) hacer reaccionar un polipéptido TACI-inmunoglobulina con un PEG reactivo en condiciones de alquilación reductora a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva del grupo α -amino del terminal amino de TACI-inmunoglobulina y (b) obtener el o los productos de reacción. El agente reductor usado para la alquilación reductora debería ser estable en solución acuosa y capaz de reducir sólo la base de Schiff formada en el procedimiento inicial de la alquilación reductora. Los agentes reductores ilustrativos incluyen borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, dimetilamin-borano, trimetilamin-borano y piridin-borano.

Para una población sustancialmente homogénea de conjugados de TACI-inmunoglobulina monopoliméricos, las condiciones de la reacción de alquilación reductora son aquéllas que permitan la unión selectiva del resto polimérico hidrosoluble con el terminal N de TACI-inmunoglobulina. Tales condiciones de reacción proporcionan generalmente diferencias de pKa entre los grupos amino de los residuos de lisina y el grupo α -amino del terminal N. El pH también afecta a la proporción entre el polímero y la proteína que se vaya a usar. En general, si el pH es inferior, se deseará un mayor exceso de polímero frente a proteína, porque cuanto menos reactivo sea el grupo α N-terminal, más polímero se necesita para alcanzar las condiciones óptimas. Si el pH es mayor, el polímero-TACI-inmunoglobulina no necesita ser tan grande, porque hay disponibles más grupos reactivos. Comúnmente, el pH estará en el intervalo de 3 a 9 o de 3 a 6.

Otro factor por considerar es el peso molecular del polímero hidrosoluble. Generalmente, cuanto más alto sea el peso molecular del polímero, menor será el número de moléculas poliméricas que podrán ser unidas a la proteína. Para las reacciones de PEGilación, el peso molecular más común es de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, o de aproximadamente 12 kDa a aproximadamente

25 kDa. La proporción molar entre el polímero hidrosoluble y TACI-inmunoglobulina estará, generalmente, en el intervalo de 1:1 a 100:1. Comúnmente, la proporción molar entre el polímero hidrosoluble y TACI-inmunoglobulina será de 1:1 a 20:1 para la poliPEGilación y de 1:1 a 5:1 para la monoPEGilación.

5 Los procedimientos generales para producir conjugados que comprenden un polipéptido y restos poliméricos hidrosolubles son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Karasiewicz *et al.*, patente estadounidense n.º 5.382.657, Greenwald *et al.*, patente estadounidense n.º 5.738.846, Nieforth *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.* 59:636 (1996), Monkarsh *et al.*, *Anal. Biochem.* 247:434 (1997)).

10 La presente invención contempla composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión, según lo definido en las reivindicaciones, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico convencional. Los ejemplos de vehículos incluyen agua, solución tampón, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares.

15 7. Aislamiento de polipéptidos TACI-inmunoglobulina

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser purificados hasta al menos aproximadamente un 80% de pureza, hasta al menos aproximadamente un 90% de pureza, hasta al menos aproximadamente un 95% de pureza o más de un 95% de pureza con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente, otras proteínas y ácidos nucleicos, y libres de agentes infecciones y pirogénicos. Los polipéptidos de la presente invención también pueden ser purificados hasta un estado farmacéuticamente puro que tenga una pureza de más del 99,9%. En ciertas preparaciones, el polipéptido purificado está sustancialmente libre de otros polipéptidos, particularmente, de otros polipéptidos de origen animal.

25 Se pueden usar procedimientos de fraccionamiento y/o purificación convencional para obtener preparaciones de polipéptidos TACI-inmunoglobulina sintéticos y polipéptidos TACI-inmunoglobulina recombinantes purificados a partir de células huésped recombinantes. En general, se puede usar la precipitación en sulfato de amonio y la extracción mediante agentes ácidos o caotrópicos para el fraccionamiento de las muestras. Las etapas de purificación ejemplares pueden incluir la exclusión por tamaño con hidroxipatita, FPLC y cromatografía en fase líquida de alta resolución de fase inversa. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices especializadas y similares. Son adecuados los derivados de PEI, DEAE, QAE y Q. Los ejemplos de medios cromatográficos incluyen aquellos medios derivados de grupos fenilo, butilo u octilo, tales como fenil-sefariosa FF (Farmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octil-Sefariosa (Farmacia) y similares; o resinas poliacrílicas, tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa entrecruzada, perlas de poliestireno, resinas de poliacrilamida entrecruzada y similares que sean insolubles en las condiciones en que vayan a ser usadas. Estos soportes se pueden modificar con grupos reactivos que permitan al unión de las proteínas por los grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de hidrato de carbono.

40 Los ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen la activación con bromuro de cianógeno, la activación con N-hidroxisuccinimida, la activación con epóxido, la activación con sulfhidrilo, la activación con hidrazina, y los derivados carboxilo y amino para las químicas de acoplamiento con carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son conocidos y se usan ampliamente en la técnica, y se pueden obtener de proveedores comerciales. La selección de un determinado procedimiento para el aislamiento y la purificación de los polipéptidos es una cuestión de diseño rutinario y está determinada, en parte, por las propiedades del soporte seleccionado. Véase, por ejemplo, "Affinity Chromatography: Principles & Methods" (Farmacia LKB Biotechnology 1988) y Doonan, "Protein Purification Protocols" (The Human Press 1996).

50 Los expertos en la técnica pueden crear otras variaciones en el aislamiento y la purificación de TACI-inmunoglobulina. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos frente a TACI o frente a Fc para aislar grandes cantidades de proteína mediante purificación por inmunoespecificidad.

Los polipéptidos de la presente invención también pueden ser aislados mediante la explotación de determinadas propiedades. Por ejemplo, se puede usar una cromatografía de adsorción de iones metálicos inmovilizados (IMAC) para purificar las proteínas ricas en histidina, incluyendo aquellas que comprenden etiquetas de polihistidina. En síntesis, primero se carga un gel con iones metálicos divalentes para formar un quelatado (Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3:1 (1985)). Se adsorberán las proteínas ricas en histidina a esta matriz con afinidades diferentes, en función del ión metálico usado, y serán eluidas mediante elución competitiva, descendiendo el pH o el uso de agentes quelantes potentes. Otros procedimientos de purificación incluyen la purificación de proteínas glicosiladas mediante la cromatografía de afinidad a la lectina, cromatografía de la proteína A y cromatografía de intercambio iónico (M. Deutscher, (ed.), *Meth. Enzymol.* 182:529 (1990)).

También se pueden preparar polipéptidos TACI-inmunoglobulina o fragmentos de los mismos mediante síntesis química, según lo descrito anteriormente. Los polipéptidos TACI-inmunoglobulina pueden ser monómeros o multímeros; glicosilados o no glicosilados; PEGilados o no PEGilados; y pueden o no incluir un residuo de aminoácido de metionina inicial. Una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina puede estar no glicosilada, glicosilada o glicosilada sólo en el resto de TACI o en el resto de inmunoglobulina. El resto de inmunoglobulina se puede obtener de un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

8. Usos terapéuticos de los polipéptidos TACI-inmunoglobulina

Las proteínas TACI-inmunoglobulina se pueden usar para modular el sistema inmune mediante su unión con ZTNF4 o ZTNF2, evitando así la unión de estos ligandos con receptores TACI o BCMA endógenos. Por consiguiente, la presente memoria describe específicamente el uso de proteínas TACI-inmunoglobulina en un sujeto que carezca de una cantidad adecuada de receptores TACI o BCMA, o que produzca un exceso de ZTNF4 o ZTNF2. Estas moléculas se pueden administrar a cualquier sujeto en necesidad de tratamiento. La presente invención contempla usos terapéuticos tanto veterinarios como humanos, según lo definido en las reivindicaciones, incluyendo los sujetos ilustrativos sujetos mamíferos, tales como animales de granja, animales domésticos y pacientes humanos.

Los polipéptidos TACI-inmunoglobulina se pueden usar para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, cánceres de células B, inmunomodulación, IBD y patologías mediadas por anticuerpos frente a IBD o cualquier anticuerpo (p. ej., ITCP, miastenia grave y similares), enfermedades renales, respuesta inmune indirecta de células T, rechazo de injertos y la enfermedad del injerto frente al huésped. Los polipéptidos de la presente invención pueden ser dirigidos a regular específicamente las respuestas de las células B durante una respuesta inmune. Además, los polipéptidos de la presente invención se pueden usar para modular el desarrollo de las células B, el desarrollo de otras células, la producción de anticuerpos y la producción de citocina. Los polipéptidos de la presente invención también pueden modular la comunicación de las células T y B mediante la neutralización de los efectos proliferativos de ZTNF4.

Los polipéptidos TACI-inmunoglobulina de la presente invención pueden ser útiles para neutralizar los efectos de ZTNF24 para tratar leucemias de células pre-B o B, tales como leucemia de células plasmáticas, leucemia linfocítica crónica o aguda, mielomas tales como el mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, mieloma endotelial y mieloma de células gigantes, y linfomas tales como linfoma de no Hodgkin, para los que está asociado un aumento de los polipéptidos ZTNF4.

ZTNF4 se expresa en células CD8+, monocitos, células dendríticas, monocitos activados, lo que indica que, en ciertos trastornos auto-inmunes, las células T citotóxicas podrían estimular la producción de células B a través de un exceso en la producción de ZTNF4. Las proteínas inmunosupresoras que bloquean selectivamente la acción de los linfocitos B serían de utilidad en el tratamiento de la enfermedad. La producción de auto-anticuerpos es común en varias enfermedades autoinmunes y contribuye a la destrucción de tejidos y al agravamiento de la enfermedad. Los auto-anticuerpos también pueden conducir a la aparición de complicaciones en la sedimentación de complejos inmunes y conducir a muchos síntomas del lupus eritematoso sistémico, incluyendo la insuficiencia renal, síntomas neurálgicos y la muerte. La modulación de la producción de anticuerpos independiente de la respuesta celular también sería beneficiosa en muchos estados patológicos. También se ha observado que las células B desempeñan un papel en la secreción de las inmunoglobulinas artríticas en la artritis reumatoide. Como tal, la inhibición de la producción de anticuerpos frente a ZTNF4 sería beneficiosa en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como la miastenia grave, la artritis reumatoide, la artritis reumatoide juvenil de curso poliarticular y la artritis psoriática. Los agentes terapéuticos inmunosupresores tales como las proteínas TACI-inmunoglobulina que bloquean o neutralizan selectivamente la acción de los linfocitos B serían útiles a tales efectos.

La invención proporciona usos que emplean proteínas TACI-inmunoglobulina para bloquear o neutralizar selectivamente las acciones de las células B en asociación con enfermedades renales en un estadio final, que pueden estar o no asociadas con enfermedades autoinmunes. Tales procedimientos también serían útiles para tratar enfermedades renales inmunológicas. Tales procedimientos serían útiles para tratar glomerulonefritis asociada con enfermedades tales como nefropatía membranosa, nefropatía por IgA o enfermedad de Berger, nefropatía por IgM, enfermedad de Goodpasture, glomerulonefritis post-infecciosa, enfermedad mesangioproliferativa, leucemia linfocítica crónica, síndrome nefrótico de cambio mínimo. Tales procedimientos también servirían como aplicaciones terapéuticas para tratar glomerulonefritis secundaria o vasculitis asociadas con enfermedades tales como el lupus, poliarteritis, Henoch-Schönlein, esclerodermia, enfermedades relacionadas con el VIH, amiloidosis y síndrome urémico hemolítico. Los usos de la presente invención también serían útiles como parte de una aplicación terapéutica para tratar nefritis intersticial o pielonefritis asociada con pielonefritis crónica, abuso de analgésicos, nefrocalcinosis, nefropatía provocada por otros agentes, nefrolitiasis o nefritis intersticial crónica o aguda.

La presente memoria describe el uso de proteínas TACI-inmunoglobulina en el tratamiento de enfermedades hipertensivas o de vasos grandes, incluyendo la estenosis u oclusión de las arterias renales y los émbolos de colesterol o émbolos renales.

La presente invención también proporciona usos para el tratamiento de neoplasmas renales o urológicos, mielomas múltiples, linfomas, neuropatía o amiloidosis de cadena ligera.

La invención también proporciona usos para bloquear o inhibir células B activadas usando proteínas TACI-inmunoglobulina para el tratamiento del asma y de otras enfermedades de las vías respiratorias crónicas, tales como la bronquitis y el enfisema. Las proteínas TACI-inmunoglobulina descritas en la presente memoria también se pueden usar para tratar el Síndrome de Sjögren.

También se proporcionan usos para inhibir o neutralizar un respuesta de células T efectoras usando proteínas TACI-inmunoglobulina para su uso en inmunosupresión, en concreto, para un uso terapéutico tal como la enfermedad del injerto frente al huésped y el rechazo de injertos. Además, las proteínas TACI-inmunoglobulina serían útiles en

protocolos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM) y la enfermedad de Crohn. Los usos de la presente invención tendrían un valor terapéutico adicional para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, en concreto, para disminuir el dolor articular, la hinchazón, la anemia y otros síntomas asociados, así como para tratar el choque séptico.

Hay modelos animales bien establecidos disponibles para analizar la eficacia *in vivo* de las proteínas TACI-inmunoglobulina de la presente invención en ciertos estados patológicos. En concreto, se pueden analizar las proteínas TACI-inmunoglobulina *in vivo* en un número de modelos animales de enfermedad autoinmune, tales como cepas congénitas de ratones *MRL-lpr/lpr* o NZB x NZW F1, que sirven como modelo del LES (lupus eritematoso sistémico). Tales modelos animales son conocidos en la técnica.

La descendencia de un cruce entre ratones negros de Nueva Zelanda (NZB) y ratones blancos de Nueva Zelanda (NZW) desarrolla una forma espontánea de LES que se asemeja mucho al LES en seres humanos. La descendencia de los ratones, conocida como NZBW, comienza a desarrollar auto-anticuerpos IgM frente a las células T a 1 mes de edad, y a los 5-7 meses de edad, los auto-anticuerpos frente al ADN de Ig son la inmunoglobulina dominante. La hiperactividad de las células B policlonales conduce a la sobre-producción de los auto-anticuerpos. La sedimentación de estos auto-anticuerpos, particularmente, de los dirigidos frente al ADN monocatenario, está asociada con el desarrollo de la glomerulonefritis, que se manifiesta clínicamente como proteinuria, azotemia y muerte a partir de la insuficiencia renal. La insuficiencia de riñón es la causa principal de mortalidad en los ratones afectados de LES espontáneo y en la cepa NZBW, este procedimiento es crónico y obliterativo. La enfermedad es más rápida y grave en hembras que en machos, con una supervivencia media de sólo 245 días en comparación con los 406 días para los machos. Mientras que muchos de los ratones hembra serán sintomáticos (proteinuria) a los 7-9 meses de edad, algunos pueden ser mucho más jóvenes o más viejos cuando desarrollen los síntomas. La nefritis inmune mortal observada en los ratones NZBW es muy similar a la glomerulonefritis observada en el LES humano, lo que convierte a este modelo murino espontáneo en útil para analizar los posibles agentes terapéuticos para el LES.

Los modelos de ratón para la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) se han usado como herramienta para investigar tanto los mecanismos de las enfermedades mediadas por el sistema inmunológico como los procedimientos de una posible intervención terapéutica. El modelo se asemeja a la esclerosis múltiple humana y produce una desmielinización como resultado de la activación de células T a neuroproteínas tales como la proteína básica mielina (MBP) o la proteína proteolipídica (PLP). La inoculación con antígeno conduce a la inducción de CD4+, células T restringidas al MHC de clase II (Th1). Los cambios en el protocolo para la EAE pueden producir variantes agudas, recidivas crónicas o de transferencia pasiva del modelo.

En el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica, que se asemeja mucho a la artritis reumatoide humana (AR). Como la AIC comparte características inmunológicas y patológicas similares con la AR, éste se convierte en un modelo ideal para rastrear los posibles compuestos anti-inflamatorios humanos. Otra ventaja del uso del modelo de AIC es que los mecanismos de patogénesis son conocidos. Se han identificado los epítomos de células T y B en el colágeno de tipo II, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpo frente al colágeno) e inflamatorios (citocinas, quimiocinas y enzimas degradantes de la matriz) relativos a la artritis mediada por el sistema inmune, y se pueden usar para medir la eficacia de los compuestos de prueba en los modelos.

La miastenia grave (MG) es otra enfermedad autoinmune para la que hay disponibles modelos murinos. La MG es un trastorno de transmisión neuromuscular que implica la producción de auto-anticuerpos dirigidos frente al receptor de la acetilcolina nicotínica (AChR). La MG es adquirida o heredada con características clínicas que incluyen una debilidad anormal y una fatiga al realizar ejercicio. Se ha establecido un modelo de ratones de la MG. La miastenia grave autoinmune experimental (MGAE) es una enfermedad mediada por anticuerpos caracterizada por la presencia de anticuerpos frente al AChR. Estos anticuerpos destruyen el receptor conduciendo a impulsos eléctricos neuromusculares defectuosos, que dan como resultado una debilidad muscular. En el modelo de la MGAE, se inmunizan los ratones con el receptor de la acetilcolina nicotínica. Los signos clínicos de la MG se hacen evidentes semanas después de la segunda inmunización. La MGAE se evalúa mediante varios procedimientos que incluyen la medición de los niveles en suero de los anticuerpos frente al AChR mediante radioinmunoanálisis, la medición del AChR muscular o la electromiografía.

Generalmente, la dosis de la proteína TACI-inmunoglobulina administrada variará en función de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, el estado de salud general y el historial médico previo del sujeto. Comúnmente, es deseable proporcionar al receptor una dosis de proteína TACI-inmunoglobulina que esté en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del sujeto), aunque también se puede administrar una dosis más baja o más alta según las circunstancias.

La administración de una proteína TACI-inmunoglobulina a un sujeto puede ser intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, por perfusión mediante un catéter regional o mediante inyección intralesional directa. Cuando se administran las proteínas terapéuticas por inyección, la administración puede ser mediante infusión continua, o mediante un solo o múltiples bolos.

Otras vías de administración incluyen la vía oral, por la membrana mucosa, pulmonar y transcutánea. La administración oral es adecuada para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas proteínoides, microesferas

de policianoacrilato y sistemas basados en lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins" en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). La viabilidad de una administración intranasal está ejemplificada mediante un modo tal como la administración de insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe y Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:199 (1999)). Las partículas en polvo o líquidas que comprenden TACI-inmunoglobulina se pueden preparar y ser inhaladas con la ayuda de dispensadores de polvo seco, generadores de aerosol líquido o nebulizadores (p.ej., Pettit y Gombotz, *TIBTECH* 16:343 (1998); Patton *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:235 (1999)). Este enfoque se ilustra mediante el sistema de tratamiento de la diabetes AERX, que es un inhalador electrónico de mano que administra insulina en aerosol a los pulmones. Los estudios han mostrado que se han administrado proteínas tan grandes como de 48.000 kDa a través de la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonido de baja frecuencia, lo que ilustra la viabilidad de la administración transcutánea (Mitragotri *et al.*, *Science* 269:850 (1995)). La administración transdérmica mediante el uso de electroporación proporciona otro medio para administrar una proteína TACI-inmunoglobulina (Potts *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10:213 (1997)).

Se puede formular una composición farmacéutica que comprenda una proteína TACI-inmunoglobulina según los procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los cuales las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. La solución salina estéril tamponada con fosfato es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la técnica conocen otros vehículos adecuados. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, XIX Edición (Mack Publishing Company 1995).

A efectos terapéuticos, las proteínas TACI-inmunoglobulina se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una proteína TACI-inmunoglobulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente relevante. Un agente es fisiológicamente relevante si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar una inflamación es fisiológicamente relevante si su presencia calma la respuesta inflamatoria. Como otro ejemplo, un agente usado para inhibir el crecimiento de células tumorales es fisiológicamente relevante si la administración del agente da como resultado una disminución del número de células tumorales, una disminución de la metástasis, una disminución del tamaño de un tumor sólido o un aumento de la necrosis de un tumor. Además, un agente usado para tratar el lupus eritematoso sistémico es fisiológicamente relevante si la administración del agente da como resultado una disminución de los anticuerpos circulantes frente al ADN bicatenario o una disminución en al menos uno de los siguientes síntomas: fiebre, dolor articular, lesiones cutáneas eritematosas u otras características del lupus eritematoso sistémico. Un ejemplo de la indicación general de administrar una proteína TACI-inmunoglobulina en una cantidad terapéuticamente eficaz es que, tras su administración a un sujeto, haya una disminución de los niveles de circulación de ZTNF4 (BLyS).

Se puede preparar una composición farmacéutica que comprenda una proteína TACI-inmunoglobulina en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables y suspensiones orales. Los ejemplos de formas sólidas incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante bombas miniosmóticas e implantes (Bremer *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery" en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer *et al.*, "Protein Delivery with Infusion Pumps" en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey *et al.*, "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant" en *Protein Delivery: Physical System*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)).

Los liposomas proporcionan un medio para administrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto intravenosamente, intraperitonealmente, intratecalmente, intramuscularmente, subcutáneamente o mediante administración oral, por inhalación o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que constan de uno o más compartimentos acuosos rodeados de bicapas lipídicas (véase, en general, Bakker-Woudenberg *et al.*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Supl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993) y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers" en *Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger* (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas tienen una composición similar a las membranas celulares y, como resultado de ello, los liposomas pueden ser administrados de manera segura, siendo biodegradables. En función del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares, y los liposomas pueden variar en el tamaño con diámetros que varían de 0,02 μm a más de 10 μm . Se puede encapsular una variedad de agentes en los liposomas: La división de los agentes hidrófobos en las bicapas y la división de los agentes hidrófilos en el espacio o los espacios acuosos internos (véase, por ejemplo, Machy *et al.*, "Liposomes In Cell Biology And Pharmacology" (John Libbey 1987) y Ostro *et al.*, *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño de los liposomas, el número de las bicapas, la composición lipídica, así como las características de carga y superficie de los liposomas.

Los liposomas pueden adsorberse a casi cualquier tipo de célula y luego liberar lentamente el agente encapsulado. Alternativamente, un liposoma absorbido puede ser sometido a endocitosis por células que sean fagocíticas. La endocitosis es seguida por la degradación intralisosomal de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados (Scherphof *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Tras la administración intravenosa, los pequeños liposomas (0,1 a 1,0 μm) son comúnmente absorbidos por las células del sistema reticuloendotelial, ubicado princi-

palmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas más grandes de $3,0 \mu\text{m}$ son depositados en el pulmón. Esta absorción preferencial de los liposomas más pequeños por las células del sistema reticuloendotelial ha sido usada para administrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores del hígado.

5 El sistema reticuloendotelial puede ser sorteado por varios procedimientos que incluyen la saturación con grandes dosis de partículas liposomales o la desactivación selectiva de macrófagos mediante procedimientos farmacológicos (Claassen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). Además, se ha observado que la incorporación de fosfolípidos derivados de glicolípidos o de polietilenglicol en las membranas liposomales da como resultado una reducción significativa de la absorción por parte del sistema reticuloendotelial (Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

También se pueden preparar los liposomas para dirigirlos a determinadas células u órganos variando la composición fosfolipídica o mediante la inserción de receptores o ligandos en los liposomas. Por ejemplo, se han usado liposomas preparados con un alto contenido de un tensioactivo no iónico para dirigirlos al hígado (Hayakawa *et al.*, patente japonesa 04-244.018; Kato *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). Estas formulaciones fueron preparadas mezclando fospatidilcolina de soja, α -tocoferol y aceite de ricino hidrogenado etoxilado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla al vacío y luego reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha observado una formulación liposomal de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) dirigirse al hígado (Shimizu *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 20:881 (1997)).

Alternativamente, se pueden unir diversos ligandos dirigidos con la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, carbohidratos, vitaminas y proteínas transportadoras. Por ejemplo, se pueden modificar liposomas con derivados galactosilipídicos de tipo ramificado para dirigirlos a receptores de asialoglicoproteínas (galactosa), que se expresan exclusivamente sobre la superficie de células de hígado (Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287 (1997); Murahashi *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). De manera similar, Wu *et al.*, *Hepatology* 27:772 (1998), han observado que el marcaje de liposomas con asialofetuína condujo a una reducción de la vida media en plasma de los liposomas, aumentando enormemente la absorción del liposoma marcado con asialofetuína por los hepatocitos. Por otro lado, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosilípidos de tipo ramificado puede ser inhibida mediante una preinyección de asialofetuína (Murahashi *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Los liposomas de albúmina de suero humano poliacetonilados proporcionan otro enfoque para dirigir liposomas a las células de hígado (Kamps *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 94:11681 (1997)). Además, Geho, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.603.044, describen un sistema de administración de vesículas de liposoma dirigidas a los hepatocitos que tiene especificidad por receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.

En un enfoque más general sobre la dirección hacia tejidos, las células diana son marcadas previamente con anticuerpos biotinilados específicos de un ligando expresado por la célula diana (Harasym *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)). Tras la eliminación del anticuerpo libre del plasma, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otro enfoque, los anticuerpos dirigidos son unidos directamente con los liposomas (Harasym *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)).

Las proteínas TACI-inmunoglobulina se pueden encapsular en los liposomas usando técnicas estándar de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson *et al.*, *Infect. Immun.* 31:1099 (1981), Anderson *et al.*, *Cancer Res.* 50:1853 (1990) y Cohen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95 (1991), Alving *et al.* "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies" en *Liposomae Technology*, II Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef *et al.*, *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987)). Según lo indicado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener una variedad de componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Se han diseñado microesferas de polímeros degradables para mantener niveles sistémicos elevados de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables, tales como poli(lactida-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli(orto-ésteres), polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en los que las proteínas están inmovilizadas en el polímero (Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery" en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery" en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus *et al.*, *Science* 281:1161 (1998); Putney y Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548 (1998)). Las nanoesferas revestidas de polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para una administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10: 167 (1997)).

La presente memoria describe proteínas TACI-inmunoglobulina modificadas químicamente en las que el polipéptido está ligado con un polímero, según lo tratado anteriormente.

Los expertos en la técnica pueden crear otras formas de dosificación, como muestran, por ejemplo, Ansel y Popovich, "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", V Edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), "Remington's Pharmaceutical Sciences", XIX Edición (Mack Publishing Company 1995) y por Ranade y Hollinger, "Drug Delivery Systems" (CRC Press 1996).

A modo ilustrativo, las composiciones farmacéuticas se pueden suministrar como un equipo que comprende un recipiente que comprende una proteína TACI-inmunoglobulina. Los polipéptidos terapéuticos se pueden proporcionar en forma de una solución inyectable para una sola o múltiples dosis, o en forma de un polvo estéril que será reconstituido antes de su inyección. Alternativamente, tal equipo puede incluir un dispensador de polvos secos, un generador de aerosol líquido o un nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico. Tal equipo puede comprender además información por escrito sobre las indicaciones y el uso de la composición farmacéutica. Además, tal información puede incluir la afirmación de que la composición de proteína TACI-inmunoglobulina está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida bien hacia el resto de receptor TACI o el resto de inmunoglobulina.

9. Usos terapéuticos de las secuencias de nucleótidos de TACI-inmunoglobulina

La presente memoria describe el uso de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión de TACI e inmunoglobulina para proporcionar estas proteínas de fusión a un sujeto en necesidad de tal tratamiento. Para un uso terapéutico veterinario o un uso terapéutico humano, se pueden administrar tales moléculas de ácido nucleico a un sujeto que tenga un trastorno o una enfermedad, según lo tratado anteriormente. Como en un ejemplo tratado anteriormente, las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina se pueden usar para un tratamiento a largo plazo del lupus eritematoso sistémico.

Existen numerosos enfoques para introducir un gen de TACI-inmunoglobulina en un sujeto, incluyendo el uso de células huésped recombinantes que expresan TACI-inmunoglobulina, la administración de ácido nucleico desnudo que codifica TACI-inmunoglobulina, el uso de un vehículo lipídico catiónico con una molécula de ácido nucleico que codifica TACI-inmunoglobulina y el uso de virus que expresan TACI-inmunoglobulina, tales como retrovirus recombinantes, virus adeno-asociados recombinantes, adenovirus recombinantes y virus del *Herpes simplex* recombinantes (véase, por ejemplo, Mulligan, *Science* 260:926 (1993), Rosenberg *et al.*, *Science* 242:1575 (1988), LaSalle *et al.*, *Science* 259:988 (1993), Wolff *et al.*, *Science* 247:1465 (1990), Breakfield y Deluca, *The New Biologist* 3:203 (1991)). En un enfoque *ex vivo*, por ejemplo, las células son aisladas de un sujeto, transfectadas con un vector que expresa un gen de TACI-inmunoglobulina y luego transplantadas en el sujeto.

Para efectuar la expresión de un gen de TACI-inmunoglobulina, se construye un vector de expresión en el que una secuencia de nucleótidos que codifica un gen de TACI-inmunoglobulina está ligada operativamente a un promotor central y, opcionalmente, a un elemento regulador para controlar la transcripción del gen. Los requisitos generales de un vector de expresión se describen anteriormente.

Alternativamente, se puede administrar un gen de TACI-inmunoglobulina usando vectores víricos recombinantes (p. ej., Kass-Eisler *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 90:11498 (1993), Kolls *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 91:215 (1994), Li *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 4:403 (1993), Vincent *et al.*, *Nat. Genet.* 5:130 (1993) y Zabner *et al.*, *Cell* 75:207 (1993)), vectores víricos asociados con adenovirus (Flotte *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 90:10613 (1993)), virus alfa tales como el virus del Bosque de Semliki y el virus Sindbis (Hertz y Huang, *J. Vir.* 66:857 (1992), Raju y Huang, *J. Vir.* 65:2501 (1991) y Xiong *et al.*, *Science* 243:1188 (1989)), vectores del virus del Herpes (p. ej., patentes estadounidenses n.º 4.769.331, 4.859.587, 5.288.641 y 5.328.688), vectores de parvovirus (Koering *et al.*, *Hum. Gene Therap.* 5:457 (1994)), vectores del virus de la viruela (Ozaki *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193:653 (1993), Panicali y Paoletti, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 79:4927 (1982)), virus de la viruela, tales como el virus de la viruela de canario o el virus Vaccinia (Fisher-Hoch *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 86:317 (1989) y Flexner *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86 (1989)) y retrovirus (p. ej., Baba *et al.*, *J. Neurosurg* 79:729 (1993), Ram *et al.*, *Cancer Res.* 53:83 (1993), Takamiya *et al.*, *J. Neurosci. Res* 33:493 (1992), Vile y Hart, *Cancer Res.* 53:962 (1993), Vile y Hart, *Cancer Res.* 53:3860 (1993) y Anderson *et al.*, patente estadounidense n.º 5.399.346). En diversas realizaciones, se puede utilizar bien el propio vector vírico, o una partícula vírica que contenga al vector vírico, en los procedimientos y las composiciones descritos más adelante.

Como ilustración de un sistema, el adenovirus, un virus de ADN bicatenario, es un vector de transferencia génica bien caracterizado para la administración de una molécula de ácido nucleico heteróloga (para más información, véase Becker *et al.*, *Meth. Cell Biol.* 43:161 (1994); Douglas y Curiel, *Science & Medicine* 4:44 (1997)). El sistema de adenovirus ofrece varias ventajas que incluyen: (i) la capacidad de alojar insertos de ADN relativamente grandes; (ii) la capacidad de ser desarrollado hasta títulos elevados; (iii) la capacidad para infectar una amplia selección de tipos de células de mamífero; y (iv) la capacidad para ser usado con promotores muy diferentes, incluyendo promotores ubicuos, específicos de un tejido y regulables. Además, se pueden administrar adenovirus mediante inyección intravenosa, porque los virus son estables en el torrente sanguíneo.

Usando vectores de adenovirus en los que hay eliminadas partes del genoma del adenovirus, se incorporan insertos en el ADN vírico mediante la unión directa o mediante la recombinación homóloga con un plásmido cotransfectado. En un ejemplo de sistema, se elimina el gen E1 esencial del vector vírico, y el virus no se replicará a no ser que el gen E1 sea proporcionado por la célula huésped. Cuando se administra intravenosamente a animales intactos, el adenovirus se dirige fundamentalmente al hígado. Aunque un sistema de administración adenovírico con la eliminación de un gen E1 no puede replicarse en las células huésped, el tejido del huésped expresará y procesará una proteína heteróloga codificada. Las células huésped también secretarán la proteína heteróloga si el gen correspondiente incluye una secuencia señal secretora. Las proteínas secretadas entrarán en circulación desde el tejido que expresa el gen heterólogo (p. ej., el hígado muy vascularizado).

Además, los vectores adenovíricos que contienen diversas eliminaciones de genes víricos se pueden usar para reducir o eliminar respuestas inmunes hacia el vector. Tales adenovirus tienen eliminados E1 y, además, contienen eliminaciones de E2A o E4 (Lusky *et al.*, *J. Virol.* 72:2022 (1998); Raper *et al.*, *Human Gene Therapy* 9:671 (1998)). También se ha publicado que la eliminación de E2b reduce respuestas inmunes (Amalfitano *et al.*, *J. Virol.* 72:926 (1998)). Mediante la eliminación de todo el genoma del adenovirus, se pueden alojar insertos muy largos del ADN heterólogo. La generación de los denominados adenovirus “cobardes”, en los que se han eliminado todos los genes víricos, es particularmente ventajosa para la inserción de insertos grandes de ADN heterólogo Yeh. y Perricaudet, *FASEB J.* 11:615 (1997)).

Las reservas de títulos elevados de virus recombinantes capaces de expresar un gen terapéutico se pueden obtener a partir de células de mamífero infectadas usando procedimientos estándar. Por ejemplo, se puede preparar el virus del Herpes simplex en células Vero, según lo descrito por Brandt *et al.*, *J. Gen. Virol.* 72:2043 (1991), Herold *et al.*, *J. Gen. Virol.* 75:1211 (1994), Visalli y Brandt, *Virology* 185:419 (1991), Grau *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30:2474 (1989), Brandt *et al.*, *J. Virol. Meth.* 36:209 (1992) y por Brown y MacLean (eds.), “HSV Virus Protocols” (Humana Press 1997).

Alternativamente, se puede introducir un vector de expresión que comprenda un gen de TACI-*inmunoglobulina* en las células de un sujeto mediante la lipofección *in vivo* usando liposomas. Se pueden usar lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifique un marcador (Felgner *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* EE.UU. 84:7413 (1987); Mackey *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* EE.UU. 85:8027 (1988)). El uso de la lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* tiene ciertas ventajas prácticas. Se pueden usar liposomas para dirigir la transfección a determinados tipos de células, lo que es particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el páncreas, el hígado, el riñón y el cerebro. Los lípidos se pueden acoplar químicamente con otras moléculas a efectos de la dirección. Los péptidos dirigidos (p. ej., las hormonas o los neurotransmisores), las proteínas tales como los anticuerpos o las moléculas no peptídicas se pueden acoplar a los liposomas químicamente.

La electroporación es otro modo alternativo de administración. Por ejemplo, Aihara y Miyazaki, *Nature Biotechnology* 16:867 (1998) han demostrado el uso de electroporación *in vivo* para la transferencia de genes en el músculo.

Generalmente, la dosis de una composición que comprende un vector terapéutico que tiene una secuencia de nucleótidos de TACI-*inmunoglobulina*, tal como un virus recombinante, variará en función de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, el estado de salud general y el historial médico previo del sujeto. Las vías adecuadas de administración de vectores terapéuticos incluyen inyección intravenosa, inyección intraarterial, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección intratumoral e inyección en la cavidad que contiene un tumor. A modo ilustrativo, Horton *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* EE.UU. 96:1553 (1999), demostraron que la inyección intramuscular de ADN plasmídico que codifica interferón α produce potentes efectos antitumorales sobre los tumores primarios y metastásicos en un modelo murino.

Se puede formular una composición que comprenda vectores víricos, vectores no víricos o una combinación de vectores víricos y no víricos según los procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los cuales los vectores o los virus se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Según lo indicado anteriormente, se dice que una composición, tal como una solución salina tamponada con fosfato, es un “vehículo farmacéuticamente aceptable” si su administración puede ser tolerada por un sujeto receptor. Hay otros vehículos adecuados que son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, “Remington's Pharmaceutical Sciences”, XIX Ed. (Mack Publishing Co. 1995) y “Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics”, VII Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)).

A efectos terapéuticos, el vector terapéutico de expresión génica, o un virus recombinante que comprende tal vector, y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una combinación de un vector de expresión (o un virus) y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra en una “cantidad terapéuticamente eficaz” si la cantidad administrada es fisiológicamente relevante. Un agente es fisiológicamente relevante si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un sujeto receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar una inflamación es fisiológicamente relevante si su presencia calma la respuesta inflamatoria. Como otro ejemplo, un agente usado para inhibir el crecimiento de células tumorales es fisiológicamente relevante si la administración del agente da como resultado una disminución del número de células tumorales, una disminución de la metástasis, una disminución del tamaño de un tumor sólido o un aumento de la necrosis de un tumor.

Cuando el sujeto tratado con un vector terapéutico de expresión génica o un virus recombinante es un ser humano, entonces la terapia es, preferiblemente, una terapia de genes en células somáticas. Es decir, el tratamiento preferido para un ser humano con un vector terapéutico de expresión génica o un virus recombinante no implica introducir en células una molécula de ácido nucleico que pueda formar parte de una línea germinal humana y ser transmitida de generación en generación (es decir, terapia génica en línea germinal humana).

10. Producción de ratones transgénicos

Es posible diseñar genéticamente ratones transgénicos para que sobre-expresen secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina en todos los tejidos, o bajo el control de un elemento regulador específico de un tejido o preferido por un tejido. Estos sobre-productores de las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina se pueden usar para caracterizar el fenotipo que resulta de la sobre-expresión, y los animales transgénicos pueden servir como modelos para la enfermedad humana provocada por un exceso de la proteína receptora TACI. Los ratones transgénicos que sobre-expresan las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina también proporcionan biorreactores modelo para la producción de proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina en leche o sangre de animales de mayor tamaño. Los procedimientos para producir ratones transgénicos son conocidos por aquéllos expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Jacob, "Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice" en *Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice*, Jacob (ed.), páginas 111-124 (Academic Press, Ltd. 1994), Monastersky y Robl (eds.), "Strategies in Transgenic Animal Science" (ASM Press 1995) y Abbud y Nilson, "Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice" en *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*, Fernandez y Hoeffler (eds.), páginas 367-397 (Academic Press, Inc. 1999)).

Por ejemplo, se puede comenzar un procedimiento para generar un ratón transgénico que exprese una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina con machos fértiles adultos (sementales) (B6C3f1, de 2 a 8 meses de edad (Taconic Farms, Germantown, NY)), machos vasectomizados (castrados) (B6D2f1, de 2 a 8 meses, (Taconic Farms)), hembras fértiles prepubescentes (donantes) (B6C3f1, de 4 a 5 semanas, (Taconic Farms)) y hembras fértiles adultas (receptoras) (B6D2f1, de 2 a 4 meses, (Taconic Farms)). Se aclimatan las donantes durante una semana y luego se les inyectan aproximadamente 8 UI/ratón de gonadotropina sérica de yegua preñada (Sigma Chemical Company; St. Louis, MO) I.P., y 46-47 horas después, 8 UI/ratón de gonadotropina coriónica humana (hCG (Sigma)) I.P. para inducir una superovulación. Se aparean las donantes con los sementales tras las inyecciones de hormonas. La ovulación generalmente tiene lugar a las 13 horas de la inyección de hCG. La copulación se confirma por la presencia de un tapón vaginal la semana después del apareamiento.

Se recogen los óvulos fertilizados bajo un microscopio quirúrgico. Se recogen los oviductos y los óvulos son depositados en portaobjetos para análisis de orina que contienen hialuronidasa (Sigma). Se lavan los óvulos una vez en hialuronidasa y dos veces en medio de Whitten W640 (descrito, por ejemplo, por Menino y O'Claray, *Biol. Reprod.* 77:159 (1986) y Dienhart y Downs, *Zygote* 4:129 (1996)) que ha sido incubado con CO₂ al 5%, O₂ al 5% y N₂ al 90% a 37°C. Entonces se almacenan los óvulos en una incubadora con CO₂ al 5%/37°C hasta la microinyección.

Se linealizan de diez a veinte microgramos de ADN plasmídico que contiene una secuencia que codifica la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina, se purifican sobre gel y se vuelven a suspender en Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 0,25 mM (pH 8,0) a una concentración final de 5-10 nanogramos por microlitro para la microinyección. Por ejemplo, las secuencias que codifican la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina pueden codificar un polipéptido TACI con la eliminación de los residuos de aminoácido 1 a 29 y 111 a 154 de la SEC ID N.º 2, y un resto de inmunoglobulina Fc5.

Se microinyecta el ADN plasmídico en los óvulos cosechados contenidos en una gota de medio W640 cubierta por aceite mineral equilibrado con CO₂ tibio. Se extrae el ADN con una aguja para inyección (retirada de un tubo capilar de vidrio de borosilicato de 0,75 mm de D.I., 1 mm de D.E.) y se inyecta en los óvulos individuales. Cada óvulo es penetrado con la aguja para inyección hasta uno o ambos pronúcleos haploides.

Se inyectan picolitros de ADN en los pronúcleos y se retira la aguja para inyección sin entrar en contacto con los nucléolos. Se repite el procedimiento hasta que todos los óvulos hayan sido inyectados. Se transfieren los óvulos correctamente microinyectados a una placa de cultivo de tejido orgánico con medio W640 pregasificado para un almacenamiento durante una noche en una incubadora a 37°C/con CO₂ al 5%.

Al día siguiente, se transfieren los embriones de dos células a las receptoras pseudo-preñadas. Las receptoras son identificadas por la presencia de tapones de copulación tras la copulación con los castrados vasectomizados. Las receptoras son anestesiadas y rasuradas en el flanco dorsal izquierdo, y transferidas a un microscopio quirúrgico. Se realiza una pequeña incisión en la piel, atravesando la pared muscular, en el centro del área abdominal delimitada por la caja torácica, la silla y la pata trasera, entre medias de la rodilla y el bazo. Se sacan al exterior los órganos reproductores sobre un pequeño paño quirúrgico. Se extiende la almohadilla adiposa sobre el paño quirúrgico y se sujeta una pinza para vasos pequeña (Roboz, Rockville, MD) a la almohadilla adiposa, que se deja colgando sobre la parte trasera del ratón, evitando que los órganos se vuelvan a deslizar hacia el interior.

Con una pipeta fina de transferencia que contiene aceite mineral seguido de burbujas alternantes de W640 y aire, se transfieren 12-17 embriones de dos células sanos de la inyección del día anterior en la receptora. Se localiza la ampolla hinchada y se sujeta el oviducto entre la ampolla y la bolsa, se hace un pequeño corte en el oviducto con una aguja de 28 g cerca de la bolsa, asegurándose de no rasgar la ampolla ni la bolsa.

Se transfiere la pipeta al corte del oviducto, y se meten los embriones soplando, dejando escapar la primera burbuja de aire de la pipeta. Se presiona suavemente la almohadilla adiposa en el peritoneo y se permite el deslizamiento hacia el interior de los órganos reproductores. Se cierra la pared peritoneal con una sutura y se cierra la piel con una pinza para heridas. Los ratones se recuperan en un calentador para portaobjetos a 37°C durante un mínimo de cuatro horas.

ES 2 334 772 T3

Se devuelven las receptoras a las jaulas en parejas y se permite que transcurran los 19-21 días de gestación. Tras el nacimiento, se deja que pase un período de postparto de 19-21 días antes del destete. Se sexan los animales destetados, se colocan en jaulas separadas por sexos y se les extrae una muestra para biopsia de 0,5 cm de la cola (usada para la genotipificación) con tijeras limpias.

5 Se prepara el ADN genómico de los trozos de cola usando, por ejemplo, un equipo DNEASY de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analiza el ADN genómico por PCR usando cebadores diseñados para amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina o un gen marcador seleccionable que fue introducido en el mismo plásmido. Una vez confirmado que los animales son transgénicos, se realiza un retrocruzamiento con una cepa endogámica colocando una hembra transgénica con un macho de tipo natural o un macho transgénico con una o dos hembras de tipo natural. A medida que van naciendo las crías y son destetadas, se separan por sexos y se les corta la cola para la genotipificación.

15 Para comprobar la expresión de un transgén en un animal vivo, se realiza una hepatectomía parcial. Se prepara quirúrgicamente el abdomen superior, justo debajo de la apófisis xifoides. Usando una técnica estéril, se realiza una pequeña incisión de 1,5-2 cm debajo del esternón y se saca al exterior el lóbulo lateral izquierdo del hígado. Se hace una ligadura con seda 4-0 alrededor del lóbulo inferior sujetándolo por fuera de la cavidad corporal. Se usa una pinza atraumática para sujetar la ligadura mientras que se coloca un segundo bucle de Dexon absorbible (American Cyanamid; Wayne, N.J.) en posición proximal a la primera ligadura. Se hace un corte distal de la ligadura de Dexon y se colocan aproximadamente 100 mg del tejido de hígado extirpado en una placa Petri estéril. Se transfiere la sección de hígado extraída a un tubo de fondo redondo de polipropileno de 14 ml y se congela rápidamente en nitrógeno líquido y luego se almacena sobre hielo seco. Se cierra la zona de la cirugía con una sutura y pinzas para cerrar heridas, y se coloca la jaula de los animales sobre una placa de calentamiento a 37°C durante las 24 horas posteriores a la operación. Se controla al animal diariamente después de la operación y se retiran las pinzas a los 7-10 días después de la cirugía. Se examina el nivel de expresión del ARNm de la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para cada ratón transgénico usando un análisis de hibridación de solución de ARN o mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

30 Con el enfoque general anteriormente descrito, se han producido ratones transgénicos que expresan niveles relevantes de la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina en la leche. En este caso en particular, la secuencia que codifica la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina codificaba un polipéptido TACI con la eliminación de los residuos de aminoácido 1 a 29 y 111 a 154 de la SEC ID N.º 2, y un resto de inmunoglobulina Fc5.

35 La presente invención, descrita así de manera general, se comprenderá más fácilmente en referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo ilustrativo y no pretenden ser restrictivos de la presente invención.

Ejemplo 1

40 *Construcción de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas TACI-Fc*

Las moléculas de ácido nucleico que codifican el TACI humano fueron obtenidas durante la clonación y la expresión de los receptores de ZTNF4 según lo descrito por Gross *et al.*, *Nature* 404:995 (2000). Las secuencias codificantes contenidas en los constructos de expresión de TACI-Fc fueron generadas mediante PCR de solapamiento, usando técnicas estándar (véase, por ejemplo, Horton *et al.*, *Gene* 77:61 (1989)). Se usaron ADNc de TACI y ADNc de Fc humanos como moldes iniciales para las amplificaciones por PCR. Los cebadores para la PCR fueron diseñados para que produjeran los extremos 5' y 3' deseados de las secuencias codificantes y para introducir los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción con el fin de facilitar la inserción de estas secuencias codificantes en los vectores de expresión. Las secuencias codificantes de TACI-Fc fueron insertadas en los vectores de expresión que incluían un gen de la *dihidrofolato reductasa* murino funcional. Un vector de expresión también contenía un promotor del citomegalovirus para dirigir la expresión del transgén de proteína recombinante, un intrón de inmunoglobulina, una secuencia señal del activador tisular del plasminógeno, una secuencia interna de entrada al ribosoma, un cistron de CD8 eliminado para la selección superficial de las células transfectadas y elementos de expresión de levaduras para el crecimiento del plásmido en células de levadura.

55 El procedimiento usado para construir TACI-Fc4 ilustra un enfoque que fue usado para producir las proteínas de fusión de TACI-Fc. Se produjeron otras proteínas de fusión de TACI-Fc mediante la inserción de secuencias de nucleótidos que codificaban una proteína de fusión de TACI-Fc en un vector de expresión de mamífero y la introducción de ese vector de expresión en las células de mamífero.

60 *A. Construcción del fragmento Fc4 de Igyl*

Para preparar la proteína de fusión de TACI-Fc4, se modificó la región Fc de la IgG1 humana (la región bisagra y los dominios CH₂ y CH₃) para eliminar el receptor Fcγ1 (FcγRI) y las funciones de unión a complementos (C1q). Esta versión modificada de la Fc de la IgG1 humana fue denominada "Fc4".

Se aisló la región Fc a partir de una PCR de un banco de hígados fetales humanos (Clontech), usando los cebadores de oligo 5' ATCAGCGGAA TTCAGATCTT CAGACAAAAC TCACACATGC CCAC 3' (SEC ID N.º 7) y 5' GG

ES 2 334 772 T3

CAGTCTCT AGATCATTTA CCCGGAGACA GGGAG 3' (SEC ID N.º 8). Las mutaciones de la región Fc fueron introducidas por PCR reducir la unión a Fc γ RI. El sitio de unión a Fc γ RI (Leu-Leu-Gly-Gly; residuos de aminoácido 38 a 41 de SEC ID N.º 6, que corresponden a las posiciones del índice EU 234 a 237) fue mutado a Ala-Glu-Gly-Ala para reducir la unión a Fc γ RI (véase, por ejemplo, Duncan *et al.*, *Nature* 332:563 (1988); Baum *et al.*, *EMBO J.* 13:3992 (1994)). Se usaron los cebadores de oligonucleótido 5' CCGTGCCCAG CACCTGAAGC C GAGGGGGCA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC C 3' (SEC ID N.º 9) y 5' GGATTCTAGA TTATTTACCC GGAGACAGGG A 3' (SEC ID N.º 10) para introducir la mutación. Se añadieron a un volumen final de 50 μ l 570 ng de molde de IgFc, 5 μ l de 10 x tampón de reacción de Pfu (Stratagene), 8 μ l de dNTP 1,25 mM, 31 μ l de agua destilada, 2 μ l de cebadores de oligonucleótido 20 mM. Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentó la reacción hasta 94°C durante 1 minuto. Se añadió la polimerasa de Pfu (2,5 unidades, Stratagene) seguida de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto seguido de una prolongación a 72°C durante 7 minutos. Se fraccionaron los productos de reacción mediante electroforesis y se detectó la banda correspondiente al tamaño predicho de aproximadamente 676 pares de bases. Se extirpó esta banda del gel y se recuperó usando un equipo de extracción de gel QIAGEN QIAquickTM (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

También se usó la PCR para introducir una mutación de Ala a Ser (residuo de aminoácido 134 de SEC ID N.º 6, que corresponde a la posición del índice EU 330) y de Pro a Ser (residuo de aminoácido 135 de SEC ID N.º 6, que corresponde a la posición del índice EU 331) para reducir la unión al complemento C1q o la fijación de complementos (Duncan y Winter, *Nature* 332:788 (1988)). Se realizaron dos reacciones de la primera serie usando la secuencia de IgFc con el sitio de unión con Fc γ RI mutado como molde. Se añadieron a un volumen final de 50 μ l 1 μ l de molde de IgFc con el sitio de unión con Fc γ RI mutado, 5 μ l de 10 x tampón de reacción de Pfu (Stratagene), 8 μ l de dNTP 1,25mM, 31 μ l de agua destilada, 2 μ l de 5' GGTGGCGGCT CCCAGATGGG TCCTGTCCGA GCCCAGATCT TCAGACAAA CTCAC 3' (SEC ID N.º 11) 20 mM, un cebador 5' que comienza en el nucleótido 36 de la SEC ID N.º 5 y 2 μ l de 5' TGGGAGGGCT TTGTTGGA 3' (SEC ID N.º 12) 20 mM, un cebador 3' que comienza en el complemento del nucleótido 405 de SEC ID N.º 5. La segunda reacción contenía 2 μ l de cada una de las reservas 20 mM de los cebadores de oligonucleótido 5' TCCAACAAAG CCCTCCCATC CTCCATCCGAG AAAACCATCT CC 3' (SEC ID N.º 13), un cebador 5' que comienza en el nucleótido 388 de SEC ID N.º 5, y 5' GGATGGATCC ATGAAGCACC TGTGGTTCTT CCTCCTGCTG GTGGCGGCTC CCAGATG 3' (SEC ID N.º 14), un cebador 3', para introducir la mutación de Ala a Ser, el sitio de restricción de *Xba*I y el codón de terminación. Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentaron las reacciones hasta 94°C durante 1 minuto. Se añadió polimerasa de Pfu (2,5 unidades, Stratagene) seguida de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos seguidos de una prolongación a 72°C durante 7 minutos. Se fraccionaron los productos de reacción mediante electroforesis y se detectaron bandas correspondientes a los tamaños predichos de aproximadamente 370 y aproximadamente 395 pares de bases, respectivamente. Se extirparon las bandas del gel y se extrajeron usando un equipo de extracción de gel QIAGEN QIAquickTM (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

Se realizó una reacción de la segunda serie para unir los fragmentos anteriores y añadir el sitio de restricción *Bam*HI de 5' y una secuencia señal de la región variable de cadena pesada JBL 2'C_L de la inmunoglobulina humana (Cogne *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 18:1485 (1988)). A un volumen final de 50 μ l, se añadieron 30 μ l de agua destilada, 8 μ l de dNTP 1,25 mM, 5 μ l de 10 x tampón de reacción de la polimerasa de Pfu (Stratagene) y 1 μ l de cada uno de los dos primeros productos de la PCR. Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentó la reacción hasta 94°C durante 1 minuto. Se añadió polimerasa de Pfu (2,5 unidades) seguida de 5 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos. Se volvió a llevar la temperatura hasta 94°C y se añadieron 2 μ l de cada reserva 20 mM de 5' GGATGGATCC ATGAAGCACC TGTGGTTCTT CCTCCTGCTG GTGGCGGCTC CCAGATG 3' (SEC ID N.º 14), un cebador 5' que comienza en el nucleótido 1 de SEC ID N.º 5, y 5' GGATTCTAGA TTATTTACCC GGAGACAGGG A 3' (SEC ID N.º 10), seguidos de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, y una prolongación final de 7 minutos a 72°C. Se visualizó una parte de la reacción usando electroforesis sobre gel. Se detectó una banda de 789 pares de bases correspondiente al tamaño predicho.

B. Construcción de vectores de expresión de TACI-Fc4

Se construyeron plásmidos de expresión que comprendían una región codificante de la proteína de fusión de TACI-Fc4 mediante la recombinación homóloga en levadura. Se aisló un fragmento de ADNc de TACI usando una PCR que incluía la secuencia polipeptídica desde el nucleótido 14 al nucleótido 475 de SEC ID N.º 1. Los dos cebadores usados en la producción del fragmento de TACI fueron: (1) un cebador que contenía 40 pares de bases de la secuencia flanqueadora del vector en 5' y 17 pares de bases correspondientes al terminal amino del fragmento de TACI (5' CTCAGCCAGG AAATCCATGC CGAGTTGAGA CGCTTCCGTA GAATGAGTGG CCTGGGCCG 3'; SEC ID N.º 15); (2) 40 pares de bases del extremo 3' correspondiente a la secuencia Fc4 flanqueadora y 17 pares de bases correspondientes al terminal carboxilo del fragmento de TACI (5' GCATGTGTGA GTTTTGTCTG AAGATCTGGG CTCCTTCAGC CCCGGGAG 3'; SEC ID N.º 16). A un volumen final de 100 μ l se añadieron 10 ng del molde de TACI, 10 μ l de 10 x tampón de reacción de la polimerasa de Taq (Perkin Elmer), 8 μ l de dNTP 2,5 mM, 78 μ l de agua destilada, 2 μ l de cada una de las reservas 20 mM de los cebadores de oligonucleótido y polimerasa de Taq (2,5 unidades, Life Technology). Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentó la reacción hasta 94°C durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto seguido de una prolongación a 72°C durante 5 minutos.

ES 2 334 772 T3

El fragmento que contenía el ADNc codificante del fragmento Fc4 fue construido de una manera similar. Los dos cebadores usados en la producción del fragmento Fc4 fueron (secuencia arriba y secuencia abajo) un cebador de oligonucleótido que contenía 40 pares de bases de la secuencia flanqueadora 5' de TACI y 17 pares de bases correspondientes al terminal amino del fragmento Fc4 (5' GCACAGAGGC TCAGAAGCAA GTCCAGCTCT CCCGGGGCTG AAGGAGCCCA GATCTTCAGA 3'; SEC ID N.º 17); y un cebador de oligonucleótido que contenía 40 pares de bases del extremo 3' correspondiente a la secuencia flanqueadora del vector y 17 pares de bases correspondientes al terminal carboxilo del fragmento Fc4 (5' GGGGTGGGTA CAACCCAGCA GCTGTTTAA TCTAGATTAT TTACCCGGAG ACAGGG 3'; SEC ID N.º 18). A un volumen final de 100 μ l se añadieron 10 ng del molde de Fc4, anteriormente descrito, 10 μ l de 10 x tampón de reacción de la polimerasa de Taq (Perkin Elmer), 8 μ l de dNTP 2,5 mM, 78 μ l de agua destilada, 2 μ l de cada una de las reservas 20 mM de los oligonucleótidos y polimerasa de Taq (2,5 unidades, Life Technology). Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentó la reacción hasta 94°C durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, seguido de una prolongación a 72°C durante 5 minutos.

Se procesaron diez microlitros de cada una de las reacciones PCR de 100 μ l descritas anteriormente sobre gel de agarosa LMP al 0,8% (Seaplaque GTG) con 1 x tampón de TBE para análisis. Se precipitaron los 90 μ l restantes de cada reacción PCR con la adición de 5 μ l de cloruro de sodio 1M y 250 μ l de etanol absoluto. Se escindió el plásmido pZMP6 con *Sma*I para linealizarlo en el polilicador. El plásmido pZMP6 fue derivado del plásmido pCZR199 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, ATCC n.º 98668) y es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor temprano inmediato del citomegalovirus, un intrón consenso de la región variable del locus de cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes, un codón de terminación y un terminador de hormona del crecimiento humano. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcadores seleccionables de mamífero que tiene un promotor de SV40, un potenciador y un origen de replicación, un gen de la *dihidrofolato reductasa* y el terminador de SV40. El vector pZMP6 fue construido a partir de pCZR199 mediante la sustitución del promotor de la metalotioneína con el promotor temprano inmediato del citomegalovirus y las secuencias de Kozac del extremo 5' del marco de lectura abierto.

Se combinaron cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con 10 μ l que contenían aproximadamente 1 μ g del dominio extracelular de TACI y los fragmentos PCR de Fc4, y 100 ng del vector pZMP6 digerido por *Sma*I y transferido a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. Se sometieron a electroporación las mezclas de levadura/ADN a 0,75 kV (5 kV/cm), ∞ ohms, 25 μ F. Se añadieron a cada cubeta 600 μ l de sorbitol 1,2M y se emplacó la levadura en dos alícuotas de 300 μ l sobre placas URA-D que se incubaron a 30°C.

Tras aproximadamente 48 horas, se volvieron a suspender los transformantes de levadura Ura+ de una sola placa en 1 ml de agua y se centrifugaron brevemente hasta hacer sedimentar las células de levadura. Se volvieron a suspender los sedimentos celulares en 1 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2%; SDS al 1%; NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Se añadieron quinientos microlitros de la mezcla de lisis a un tubo Eppendorf que contenía 300 μ l de perlas de vidrio lavadas en ácido y 200 μ l de fenol-cloroformo, se sometió a movimientos vorticiales durante intervalos de 1 minuto dos o tres veces, seguidos de una centrifugación de 5 minutos en un centrifugador Eppendorf a la velocidad máxima. Se transfirieron trescientos microlitros de la fase acuosa a un tubo limpio, y se hizo precipitar el ADN con 600 μ l de etanol, siguiendo con una centrifugación durante 10 minutos a 4°C. Se volvieron a suspender los sedimentos de ADN en 100 μ l agua.

La transformación de las células de *E. coli* electrocompetentes (DH10B, GibcoBRL) se realizó con 0,5-2 ml de preparación de ADN de levadura y 40 μ l de células DH10B. Se electropulsaron las células a 2,0 kV, 25 mF y 400 ohms. Tras la electroporación, se emplacaron 1 ml de SOC (Bacto-Triptona al 2% (Difco, Detroit, MI)), extracto de levadura al 2,5% (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) en alícuotas de 250 μ l sobre cuatro placas LB/AMP (Caldo de L.B. (Lennox), Bacto-Agar al 1,8% (Difco), 100 mg/l de ampicilina).

Se identificaron clones individuales que albergaban el constructo de expresión correcto para TACI-Fc4 mediante digestión por restricción para verificar la presencia del inserto y para confirmar que diversas secuencias de ADN se habían unido correctamente entre sí. Se sometió a un análisis secuencial el inserto de clones positivos. Se aísla el ADN plasmídico a gran escala con el equipo Qiagen Maxi (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

C. Construcción de Fc5, Fc6 y Fc7

En Fc5, se volvió a cambiar el residuo de Arg de la posición de índice EU 218 por un residuo de Lys. La Igy1 humana de tipo natural contiene una lisina en esta posición. En síntesis, se produjeron moléculas de ácido nucleico que codificaban Fc5 usando los cebadores de oligonucleótido 5' GAGCCCAAATCTTCAGACAAAACCTCACA CATGCCCA 3' (SEC. ID. N.º 19) y 5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3' (SEC. ID. N.º 20). Las condiciones para la amplificación por PCR fueron las siguientes. A un volumen final de 50 μ l se añadieron 236 ng del molde de Fc4, 5 μ l de 10 x tampón de reacción de Pfu (Stratagene), 4 μ l de dNTP 2,5 mM, 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos 20 μ M y 1 μ l de polimerasa de Pfu (2,5 unidades, Stratagene). El perfil térmico de la amplificación consistió en 94°C durante 2 minutos, 5 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 42°C durante 20 segundos, 72°C durante 45 segundos, 20 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 72°C durante 1 minuto y 20 segundos, seguidos

ES 2 334 772 T3

de una prolongación a 72°C durante 7 minutos. Se fraccionó el producto de reacción mediante electroforesis sobre gel de agarosa y se detectó la banda correspondiente al tamaño predicho de aproximadamente 718 pares de bases. Se extirpó la banda del gel y se recuperó usando un equipo de extracción de gel QIAGEN QIAquick (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

5 Fc6 es idéntico a Fc5, a excepción de que el codón de lisina carboxi-terminal ha sido eliminado. Como en los Fc4 y Fc5 anteriores, el codón de terminación de la secuencia de Fc6 fue cambiado a TAA. Fc6 se generó a partir del molde de ADN que codificaba Fc5 usando los cebadores de oligonucleótido 5' GAGCCCAAATCTTCAGACAA AACTCACACA TGCCCA 3' (SEC ID N.º 19) y 5' GCGCGCCTC TAGATTAACC CGGAGACAGG GAGAGGC 10 3' (SEC ID N.º 21).

Fc7 es idéntico al Fc de $\gamma 1$ de tipo natural, a excepción de una sustitución de un aminoácido situado en la posición del índice EU Asn 297 ubicada en el dominio CH2. Se mutó Asn-297 a un residuo de Gln para evitar la unión del hidrato de carbono ligado a N en esa posición de residuo. Como antes, el codón de terminación de la secuencia de 15 Fc7 fue cambiado a TAA. Fc7 se generó mediante una PCR de solapamiento usando ADNc de Fc de IgC $\gamma 1$ humana de tipo natural como molde y los cebadores de oligonucleótido 5' GAGCCCAAATCTTGCGACAAAACACTCACA 3' (SEC ID N.º 22) y 5' GTACGTGCTTTGGTACTGCTCCTCCCGCGGCTT 3' (SEC ID N.º 23) para generar la mitad de 5' de Fc7, y los cebadores de oligonucleótido 5' CAGTACCAAAGCACGTACCGTGTGGTCA 3' (SEC ID N.º 24) y 5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3' (SEC ID N.º 20) para generar la mitad de 20 3' de Fc7. Los dos productos de la PCR se combinaron y se amplificaron usando los cebadores de oligonucleótido 5' GAGCCCAAATCTTGCGACAAAACACTCACA 3' (SEC ID N.º 22) y 5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTACCCGGAGACA 3' (SEC ID N.º 20).

25 Todos los productos resultantes de la PCR fueron purificados sobre gel, clonados y verificados mediante el análisis de las secuencias de ADN.

D. Construcción de proteínas de fusión de TACI-Fc amino-truncadas

30 Se generaron cuatro versiones truncadas en el terminal amino de TACI-Fc. Las cuatro tenían una secuencia señal modificada del activador tisular del plasminógeno humano (SEC ID N.º 25) fusionada con el residuo de aminoácido número 30 de SEC ID N.º 2. Sin embargo, las cuatro proteínas diferían en la ubicación del punto en el que Fc5 estaba fusionado con la secuencia de aminoácidos de TACI de SEC ID N.º 2. La tabla 3 resume las estructuras de las cuatro 35 proteínas de fusión.

TABLA 3

Proteínas de fusión de TACI	
Denominación de TACI-Fc	Residuos de aminoácido de TACI
TACI(d1-29)-Fc5	30 a 154 de SEC. ID. N.º 2
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	30 a 106 de SEC. ID. N.º 2
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	30 a 110 de SEC. ID. N.º 2
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	30 a 119 de SEC. ID. N.º 2

Los casetes de expresión codificantes de las proteínas se generaron mediante PCR de solapamiento usando técnicas estándar (véase, por ejemplo, Horton *et al.*, *Gene* 77:61 (1989)). Se usaron una molécula de ácido nucleico codificante de TACI y una molécula de ácido nucleico codificante de Fc5 como moldes para la PCR. En las tablas 4 y 5, se 60 identifican los cebadores de oligonucleótido.

65

ES 2 334 772 T3

TABLA 4

Cebadores de oligonucleótido usados para producir las proteínas de fusión de TACI				
Denominación de TACI-Fc5	Denominaciones de los oligonucleótidos			
	TACI 5'	TACI 3'	Fc5 5'	Fc5 3'
TACI(d1-29)-Fc5	ZC24.903	ZC24.955	ZC24.952	ZC24.946
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	ZC24.903	ZC24.951	ZC24.949	ZC24.946
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	ZC24.903	ZC28.978	ZC28.979	ZC24.946
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	ZC24.903	ZC28.981	ZC28.980	ZC24.946

TABLA 5

Secuencias de los oligonucleótidos		
Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEC. ID. N.º
ZC24.903	5'TATTAGGCCGGCCACCATGGATGCAATGA 3'	40
ZC24.955	5'TGAAGATTTGGGCTCCTTGAGACCTGGGA 3'	41
ZC24.952	5' TCCCAGGTCTCAAGGAGCCCAAATCTTCA 3'	42
ZC24.946	5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3'	20
ZC24.951	5' TGAAGATTTGGGCTCGTTCTCACAGAAGTA 3'	43
ZC24.949	5' ATACTTCTGTGAGAACGAGCCCAAATCTTCA 3'	44
ZC28.978	5' TTTGGGCTCGCTCCTGAGCTTGTTCTCACA 3'	45
ZC28.979	5' CTCAGGAGCGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	46
ZC28.981	5' TTTGGGCTCCCTGAGCTCTGGTGGAA 3'	47
ZC28.980	5' GAGCTCAGGGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	48

La primera serie de las amplificaciones por PCR constó de dos reacciones para cada una de las cuatro versiones truncadas en el terminal amino. Las dos reacciones se llevaron a cabo por separado usando los oligonucleótidos de TACI 5' y 3' en una reacción, y los oligonucleótidos de Fc5 5' y 3' en otra reacción para cada versión. Las condiciones para la primera serie de la amplificación por PCR fueron las siguientes: a un volumen final de 25 µl se añadieron aproximadamente 200 ng del molde de ADN, 2,5 µL de 10 x tampón de reacción de Pfu (Stratagene), 2 µl de dNTP 2,5 mM, 0,5 µl de cada oligonucleótido 5' y oligonucleótido 3' 20 µM y 0,5 µl de polimerasa de Pfu (2,5 unidades, Stratagene). El perfil térmico de la amplificación consistió en 94°C durante 3 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 15

ES 2 334 772 T3

segundos, 50°C durante 15 segundos, 72°C durante 2 minutos, seguidos de una prolongación a 72°C durante 2 minutos. Se fraccionaron los productos de reacción mediante electroforesis sobre gel de agarosa y se extirparon del gel las bandas correspondientes a los tamaños predichos y se recuperaron usando un equipo de extracción de gel QIAGEN QIAquick (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

5 La segunda serie de amplificación por PCR, o reacción de amplificación por PCR de solapamiento, se realizó usando los fragmentos purificados sobre gel de la primera serie de PCR como molde de ADN. Las condiciones para la segunda serie de la amplificación por PCR fueron las siguientes: a un volumen final de 25 μ l se añadieron aproximadamente 10 ng del molde de ADN del fragmento de ADN y del fragmento de Fc5, 2,5 μ L de 10 x tampón de reacción de Pfu (Stratagene), 2 μ l de dNTP 2,5 mM, 0,5 μ l de cada ZC24.903 (SEC ID N.º 40) y ZC24.946 (SEC ID N.º 20) 20 μ M y 0,5 μ l de polimerasa de Pfu (2,5 unidades, Stratagene). El perfil térmico de la amplificación consistió en 94°C durante 1 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos, 72°C durante 2 minutos, seguidos de una prolongación a 72°C durante 2 minutos. Se fraccionaron los productos de reacción mediante electroforesis sobre gel de agarosa, y se extirparon del gel las bandas correspondientes a los tamaños predichos y se recuperaron usando un equipo de extracción de gel QIAGEN QIAQUICK (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

20 Se clonó por separado cada una de las cuatro versiones de los productos de la PCR de TACI-Fc con el terminal amino truncado usando el equipo de clonación de PCR ZEROBLUNT TOPO de Invitrogen siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La tabla 6 identifica las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de estos constructos de TACI-Fc.

TABLA 6

Secuencias de las variantes de TACI-Fc		
Denominación de TACI-Fc	SEC. ID. N.º	
	Nucleótido	Aminoácido
TACI(d1-29)-Fc5	49	50
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	51	52
TACI(d1-29, d11-154)-Fc5	53	54
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	55	56

45 Una vez verificadas las secuencias de nucleótidos, se digirieron plásmidos que comprendían cada una de las cuatro versiones de las fusiones de TACI-Fc con el terminal amino truncado con *FreI* y *AscI* para liberar los segmentos codificantes de los aminoácidos. Se unieron los fragmentos de *FreI/AscI* en un vector de expresión de mamífero que contenía el promotor del CMV y un segmento poli(A) de SV40. Los vectores de expresión se introdujeron en células de ovario de hámster chino según lo descrito más adelante.

Ejemplo 2

Producción de proteínas de TACI-Fc por células de ovario de hámster chino

55 Se usaron los constructos de expresión de TACI-Fc para transfectar, mediante electroporación, células DG44 de ovario de hámster chino (CHO) adaptadas a una suspensión desarrolladas en medio libre de proteínas animales (Urlaub *et al.*, *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555 (1986)). Las células DG44 CHO carecen de un gen de la *dihidrofolato reductasa* funcional debido a las eliminaciones en ambas ubicaciones cromosómicas de la *dihidrofolato reductasa*. El crecimiento de las células en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato da como resultado la amplificación del gen de la *dihidrofolato reductasa* y del gen codificado por la proteína recombinante ligada en el constructo de expresión.

65 Se pasaron las células DG44 CHO a medio PFCHO (JRH Biosciences, Lenexa, KS), L-glutamina 4 mM (JRH Biosciences) y 1 x suplemento de hipotantina-timidina (Life Technologis), y se incubaron las células a 37°C y CO₂ al 5% en matraces de agitación Corning a 120 rpm sobre una plataforma agitadora por rotación. Las células se transfectaron por separado con plásmidos de expresión linealizados. Para garantizar la esterilidad, se realizó una sola etapa de precipitación en etanol sobre hielo durante 25 minutos mediante la combinación de 200 μ g de ADN plasmídico en un

ES 2 334 772 T3

tubo Eppendorf con 20 μ l de ADN vehículo de esperma de salmón triturado (5' \rightarrow 3' Inc. Boulder, CO, 10 mg/ml), 22 μ l de NaOAc 3M (pH 5,2) y 484 μ l de etanol al 100% (Gold Shield Chemical Co., Hayward, CA). Tras la incubación, se centrifugó el tubo a 14.000 rpm en un microcentrifugador colocado en una sala fría a 4°C, se retiró el sobrenadante y se lavaron los sedimentos dos veces con 0,5 ml de etanol al 70% y se dejaron secar al aire.

Las células DG44 CHO se prepararon mientras se secaban los sedimentos de ADN mediante la centrifugación de 10⁶ células totales (16,5 ml) en un tubo de centrifugación cónica de 25 ml a 900 rpm durante 5 minutos. Se volvieron a suspender las células DG44 CHO en un volumen total de 300 μ l de medio de crecimiento PFCHO y se colocaron en una cubeta para Gene-Pulser con una separación de las puntas del electrodo de 0,4 cm (Bio-Rad). Se volvió a suspender el ADN, tras un tiempo de secado de aproximadamente 50 minutos, en 500 μ l de medio de crecimiento PFCHO y se añadieron las células a la cubeta tal que el volumen total no superara los 800 μ l, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para disminuir la formación de burbujas. Se colocó la cubeta en una unidad II del electroporador Gene Pulser de BioRad configurado a 0,296 kV (kilovoltios) y 0,950 de AC (Alta Capacidad) y se realizó de inmediato la electroporación.

Se incubaron las células durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de colocarlas en un volumen total de 20 ml de medios PFCHO en un matraz T-75 de CoStar. Se colocó el matraz a 37°C y CO₂ al 5% durante 48 horas, luego se contaron las células con un hemocitómetro utilizando la exclusión con azul de tripano y se pusieron en medios de selección PFCHO sin suplemento de hipotantina-timidina y que contenían metotrexato 200 mM (Cal Biochem).

Tras la recuperación del procedimiento de selección en metotrexato, se examinaron los medios acondicionados que contenían proteínas TACI-Fc secretadas mediante análisis de transferencia Western.

Ejemplo 3

Análisis estructural de las proteínas TACI-Fc

En ciertos casos, se purificaron parcialmente las proteínas de fusión de TACI-Fc antes de su análisis. Se filtró de forma estéril el medio acondicionado de los cultivos de ovario de hámster chino a través de un filtro de 0,22 μ m y se capturó la proteína TACI-Fc sobre una columna de proteína A. Se eluyó el material unido a la proteína A y se pasó a una columna de exclusión por tamaño S-200 para la purificación final.

Se realizó un análisis de transferencia Western tanto en el medio celular acondicionado como en la proteína purificada para evaluar la estabilidad estructural de las proteínas TACI-Fc. En síntesis, se transfirieron muestras de proteína o de sobrenadante a membranas de nitrocelulosa y se detectaron las proteínas TACI-Fc usando IgG2a de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa (Boehringer Mannheim) o antisueros específicos de la Fc de la IgG de cabra anti-humana conjugada con peroxidasa (Pierce).

Se realizaron análisis de las secuencias de aminoácidos amino-terminales sobre los sistemas secuenciadores de proteínas modelo 476A y 494 de la División de Applied Biosystems de Perkin Elmer (Foster City, CA). Los análisis de datos se realizaron con el sistema de análisis de datos modelo 610A de Applied Biosystems para la secuenciación de proteínas, versión 2.1a (Applied Biosystems, Inc.). La mayoría de los suministros y los reactivos usados eran de Applied Biosystems, Inc.

Ejemplo 4

Análisis funcional de las proteínas TACI-Fc

Se usaron dos enfoques para examinar las características de unión para cuatro proteínas TACI-Fc con ZTNF4. Un enfoque midió la capacidad de los constructos de TACI-Fc para competir con las placas revestidas de TACI en la unión de ZTNF4 marcado con ¹²⁵I. En el segundo enfoque, se incubaron concentraciones crecientes de ZTNF4 marcado con ¹²⁵I con cada constructo de TACI-Fc, y se determinó la radiactividad asociada a los complejos de ZTNF4-TACI-Fc precipitados. Las proteínas de fusión de TACI-Fc tenían restos de TACI que carecían de los primeros 29 residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2. Una de las proteínas de fusión tenía un resto de TACI con una región del tallo intacta (TACI (d1-29)-Fc5), mientras que tres de las proteínas de fusión de TACI-Fc tenían restos de TACI con diversas eliminaciones en la región del tallo (TACI (d1-29, d107-154)-Fc5; TACI (d1-29, d111-154)-Fc5; TACI (d1-29, d120-154)-Fc5).

A. Ensayo de unión competitiva

Se radioyoduró ZTNF4 con perlas de yodo (Pierce) según los procedimientos estándar. En síntesis, se yoduraron 50 μ g del ZTNF4 con 4 mCi de ¹²⁵I usando una sola perla de yodo. Se detuvo la reacción con una solución al 0,25% de albúmina de suero bovino y se retiró el ¹²⁵I libre mediante filtración sobre gel usando una columna PD-10 (Pierce). Se determinó la radiactividad específica de las preparaciones de ¹²⁵I-ZTNF4 mediante precipitación en ácido tricloroacético antes y después de la etapa de desalinización.

ES 2 334 772 T3

Se añadió un fragmento N-terminal del receptor TACI, denominado "TACI-N" a placas de 96 pocillos (100 μ l a 0,1 μ g/ml) y se incubaron durante una noche a 4°C. Se lavaron las placas, se bloquearon con Superblock (Pierce) y se volvieron a lavar. Se mezclaron los constructos de TACI-Fc, a diversas concentraciones que variaban de 0 a 11,5 ng/ml, con una concentración fija de 125 I-ZTNF4 (20 ng/ml) y se incubaron durante 2 horas a 37°C sobre la placa revestida con TACI-N. Los controles bien contenían TACI-N en disolución o carecían de TACI-Fc. Tras la incubación, se lavaron las placas y se realizó el recuento. Cada determinación se realizó por triplicado.

Los resultados mostraron que todos los constructos de TACI-Fc inhibieron la unión de 125 I-ZTNF4 completamente a concentraciones de aproximadamente 100 ng/ml o superiores. Las proteínas TACI-Fc, TACI (d1-29)-Fc5, TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 y TACI (d1-29, d120-154)-Fc5 fueron inhibidores más eficaces que el constructo de TACI-Fc, TACI (d1-29, d107-154)-Fc5. Un fragmento Fc sólo no inhibió la unión. Se calcularon los valores de CI_{50} para cada constructo en tres experimentos. Los valores medios para los constructos fueron: TACI (d1-29)-Fc5: 2,07 nM; TACI (d1-29, d107-154)-Fc5: 4,95 nM; TACI (d-129, d111-154) Fc5: 2,31 nM; y TACI (d1-29, d120-154)-Fc5: 2,21 nM.

B. Ensayo de unión en disolución

Se incubó una concentración de 0,05 nM de cada constructo de TACI-Fc con 0,4 pM a 1,5 nM de I-ZTNF4 durante 30 minutos a temperatura ambiente en un volumen total de 0,25 ml/tubo. Se añadió una suspensión de Pansorbina (Staph A) a cada tubo y, tras 15 minutos, se centrifugaron las muestras, se lavaron dos veces y se realizó el recuento de los sedimentos. Se determinó la unión inespecífica mediante la adición de ZTNF4 sin marcar 130 nM a la mezcla de 125 I-ZTNF4/TACI-Fc. Se calculó la unión específica restando la cpm unida en presencia de ZTNF4 sin marcar de la cpm unida total a cada concentración de 125 I-ZTNF4. Cada determinación se realizó por triplicado. Se calcularon las constantes de unión usando el programa informático GraphPad Prism (MacIntosh v. 3.0).

La figura 4 ilustra la unión específica de 125 I-ZTNF4 con los diversos constructos de TACI-Fc. La unión pareció acercarse a la saturación con cada constructo, y fue significativamente superior para los constructos TACI (d1-29)-Fc5, TACI (d1-29, d111-154)-Fc5, TACI (d1-29, d120-154)-Fc5, en comparación con la unión de TACI (d1-29, d107-154)-Fc5. Se calcularon los valores de B_{max} y K_d , y en la tabla 7 se resumen los resultados.

TABLA 7

Unión de 125 I-ZTNF4 con los constructos de TACI-Fc		
Constructo de TACI-Fc	K_d (nM)	B_{max} (M)
TACI (d1-29)-Fc5	0,134	0,023
TACI (d1-29, d107-154)-Fc5	0,121	0,010
TACI (d1-29, d111-154)-Fc5	0,115	0,018
TACI (d1-29, d120-154)-Fc5	0,092	0,021

Ejemplo 5

Medición del ZTNF2 circulante

Se determinaron los niveles de ZTNF4 en los individuos con una afección patológica (tal como el LES, la artritis reumatoide, por ejemplo) en comparación con individuos normales usando un análisis de electroquimioluminiscencia. Se preparó una curva estándar a partir de ZTNF4 humano soluble a 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,01 ng/ml y 0 ng/ml en tampón ORIGIN (Igen, Gaithersburg, MD). Se diluyeron muestras de suero en tampón ORIGIN. Se incubaron los patrones y las muestras a temperatura ambiente durante dos horas con anticuerpo anti-ZTNF4-NF BV humano de conejo biotinilado diluido hasta 1 μ g/ml en tampón para análisis Origin (IGEN) y anticuerpo policlonal anti-ZTNF4-NF BV humano de conejo rutenilado diluido hasta 1 μ g/ml en tampón para análisis Origin (IGEN). Tras la incubación, se sometieron las muestras a movimientos vorticiales y se añadieron 0,4 mg/ml de perlas Dynabeads (Dynal, Oslo, Noruega) de estreptavidina a cada patrón y cada muestra a 50 μ l/tubo, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se sometieron las muestras a movimientos vorticiales y se leyeron sobre un analizador Origin (Igen) según las instrucciones del fabricante. El análisis Origin se basa en la electroquimioluminiscencia y produce una lectura en ECL. En un estudio, se detectó un nivel elevado de ZTNF4 en las muestras de suero de ratones tanto NZBWF1/J como MRL/Mpj-Fas lpr, lo que ha progresado hasta estadios avanzados de glomerulonefritis y enfermedad autoinmune.

ES 2 334 772 T3

El Análisis ORIGIN también se usó para medir los niveles de ZTNF4 en la sangre de pacientes de LES, en comparación con los niveles de circulación en individuos normales. Se preparó una curva estándar a partir de ZTNF4 humano soluble a 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,01 ng/ml y 0 ng/ml en tampón ORIGIN (Igen). Todas las muestras de los pacientes fueron procesadas por triplicado con un volumen final de 25 μ l. Se incubaron los patrones y las muestras a temperatura ambiente durante dos horas con anticuerpo de captura, anticuerpo policlonal anti-ZTNF4-NF BV humano de conejo biotinilado diluido hasta 1 μ g/ml en tampón para análisis Origin (IGEN) y un anticuerpo de detección, anticuerpo policlonal anti-ZTNF4-NF BV humano de conejo rutenilado diluido hasta 1 μ g/ml en tampón para análisis Origin (IGEN). Tras la incubación, se sometieron las muestras a movimientos vorticiales y se añadieron 0,4 mg/ml de perlas Dynabeads (Dyna) de estreptavidina a cada patrón y cada muestra a 50 μ l/tubo, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se sometieron las muestras a movimientos vorticiales y se analizaron sobre un analizador 1.5 Origin (Igen) según las instrucciones del fabricante.

Este análisis incluía 28 muestras control normales y muestras de 20 pacientes diagnosticados con LES. Se observaron niveles elevados de ZTNF4 en el suero de los pacientes diagnosticados con LES, en comparación con los donantes de suero control normal. Los niveles de ZTNF4 se calcularon como un aumento de los niveles de ZTNF4 en el paciente o las muestras control en comparación con una muestra de suero humano de referencia arbitraria. La media de las 28 muestras control fue de 1,36 veces frente a la muestra de referencia humana y la media de las 20 muestras de los pacientes de LES fue de 4,92. Siete de los 20 pacientes de LES tenían niveles de ZTNF4 que eran dos veces la media de las muestras control, mientras que sólo hubo un individuo control que presentó un nivel de más del doble de la media control.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5969102 A, Bram and von Billow [0005]
- WO 9818921 A [0006]
- WO 0040716 A [0008] [0136] [0142] [0145] [0147]
- WO 0181417 A [0009]
- US 5300435 A [0122]
- US 4599311 A, Kawasaki [0124]
- US 4931373 A, Kawasaki [0124]
- US 4870008 A, Brake [0124]
- US 5037743 A, Welch [0124]
- US 4845075 A, Murray [0124]
- US 4615974 A, Kingsman [0124]
- US 4977092 A [0124]
- US 4990446 A [0124]
- US 5063154 A [0124]
- US 5139936 A [0124]
- US 4661454 A [0124]
- US 4882279 A, Cregg [0125]
- US 4935349 A, McKnight [0125]
- US 5162228 A, Sumino [0125]

ES 2 334 772 T3

- US 4486533 A, Lambowitz [0125]
- US 5716808 A, Raymond [0126]
- 5 • US 5736383 A, Raymond [0126]
- WO 9717450 A [0126]
- WO 9717451 A [0126]
- 10 • WO 9802536 A [0126]
- WO 9802565 A [0126]
- 15 • US 5252714 A, Harries [0155]
- EP 0154316 A [0157]
- US 5382657 A, Karasiewicz [0157] [0165]
- 20 • US 5738846 A, Greenwald [0165]
- JP 4244018 A [0196]
- 25 • US 4603044 A, Geho [0197]
- US 4769331 A [0207]
- US 4859587 A [0207]
- 30 • US 5288641 A [0207]
- US 5328688 A [0207]
- 35 • US 5399346 A, Anderson [0207]
- US 60293343 B [0274]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- 40 • **Arai et al.** *Annu. Rev. Biochem.*, 1990, vol. 59, 783 [0002]
- **Mosmann.** *Curr. Opin. Immunol.*, 1991, vol. 3, 311 [0002]
- 45 • **Paul; Seder.** *Cell*, 1994, vol. 76, 241 [0002]
- **Yao et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 5483 [0002]
- **Fossiez et al.** *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 2593 [0002]
- 50 • **Cosman.** *Stem Cells*, 1994, vol. 12, 440 [0004]
- **Wajant et al.** *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1999, vol. 10, 15 [0004]
- 55 • **Yeh et al.** *Immunol. Rev.*, 1999, vol. 169, 283 [0004]
- **Idriss; Naismith.** *Microsc. Res. Tech.*, 2000, vol. 50, 184 [0004]
- von **Billow; Bram.** *Science*, 1997, vol. 228, 138 [0005]
- 60 • **Moore et al.** *Science*, 1999, vol. 285, 269 [0006]
- **Mukhopadhyay et al.** *J Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 15978 [0006]
- 65 • **Schneider et al.** *J. Exp. Med.*, 1999, vol. 189, 1747 [0006]
- **Shu et al.** *J Leukoc. Biol.*, 1999, vol. 65, 680 [0006]

ES 2 334 772 T3

- **Hahne et al.** *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 1185 [0006]
- **Kelly et al.** *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 1021 [0006]
- 5 • **Gross et al.** *Nature*, 2000, vol. 404, 995 [0006] [0232]
- **McGehee et al.** *Mol. Endocrinol.*, 1993, vol. 7, 551 [0033]
- **Treisman.** *Seminars in Cancer Biol.*, 1990, vol. 1, 47 [0033]
- 10 • **O'Reilly et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 19938 [0033]
- **Ye et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 25728 [0033]
- 15 • **Loeken.** *Gene Expr.*, 1993, vol. 3, 253 [0033]
- Molecular Biology of the Gene. *The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc*, 1987 [0033]
- **Lemaigre; Rousseau.** *Biochem. J.*, 1994, vol. 303, 1 [0033]
- 20 • **Nilsson et al.** *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 1075 [0063]
- **Nilsson et al.** *Methods Enzymol.*, 1991, vol. 198, 3 [0063]
- 25 • **Smith; Johnson.** *Gene*, 1988, vol. 67, 31 [0063]
- **Grussenmeyer et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 7952 [0063]
- **Hopp et al.** *Biotechnology*, 1988, vol. 6, 1204 [0063]
- 30 • **Ford et al.** Protein Expression and Purification, 1991, vol. 2, 95 [0063]
- von **Billow; Bram.** *Science*, 1997, vol. 278, 138 [0071] [0072]
- 35 • **Duncan et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 563 [0081] [0235]
- **Sondermann et al.** *Nature*, 2000, vol. 406, 267 [0081] [0086]
- **Wines et al.** *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, 5313 [0081]
- 40 • **Canfield; Morrison.** *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 173, 1483 [0082]
- **Tao et al.** *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 178, 661 [0082]
- 45 • **Putman.** The Plasma Proteins. *Academic Press, Inc*, 1957, vol. V, 49-140 [0097]
- Short Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons*, 1995, 4-14-6 [0103]
- **Wu et al.** Methods in Gene Biotechnology. *CRC Press, Inc*, 1997, 33-41 [0103]
- 50 • **Adang et al.** *Plant Molec. Biol.*, 1993, vol. 21, 1131 [0104]
- **Bambot et al.** *PCR Methods and Applications*, 1993, vol. 2, 266 [0104]
- 55 • Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes. Dillon *et al.* Methods in Molecular Biology, vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications. *Humana Press, Inc*, 1993, vol. 15, 263-268 [0104]
- **Holowachuk et al.** *PCR Methods Appl.*, 1995, vol. 4, 299 [0104]
- 60 • **Glick; Pasternak.** Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA. *ASM Press*, 1994 [0105]
- **Itakura et al.** *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323 [0105]
- 65 • **Climie et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 633 [0105]
- **Near et al.** *Mol. Immunol.*, 1990, vol. 27, 901 [0108]

ES 2 334 772 T3

- **Chasin et al.** *Som. Cell. Molec. Genet.*, 1986, vol. 12, 555 [0109]
- **Hamer et al.** *J. Molec. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 273 [0111]
- 5 • **McKnight.** *Cell*, 1982, vol. 31, 355 [0111]
- **Benoist et al.** *Nature*, 1981, vol. 290, 304 [0111]
- **Gorman et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 6777 [0111]
- 10 • **Foecking et al.** *Gene*, 1980, vol. 45, 101 [0111]
- Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture. **Etcheverry et al.** *Protein Engineering: Principles and Practice.* *John Wiley & Sons, Inc.*, 1996, 163-181 [0111]
- 15 • **Zhou et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 4529 [0112]
- **Kaufman et al.** *Nucl. Acids. Res.*, 1991, vol. 19, 4485 [0112]
- 20 • Gene Transfer and Expression Protocols. *Humana Press*, 1991 [0113]
- **Becker et al.** *Meth. Cell Biol.*, 1994, vol. 43, 161 [0115] [0208]
- **Douglas; Curiel.** *Science & Medicine*, 1997, vol. 4, 44 [0115] [0208]
- 25 • **Gamier et al.** *Cytotechnol.*, 1994, vol. 15, 145 [0116]
- **Luckow et al.** *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 4566 [0120]
- 30 • **Hill-Perkins; Possee.** *J. Gen. Virol.*, 1990, vol. 71, 971 [0120] [0121]
- **Bonning et al.** *J. Gen. Virol.*, 1994, vol. 75, 1551 [0120] [0121]
- **Chazenbalk; Rapoport.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 1543 [0120] [0121]
- 35 • **Grussenmeyer et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 1985, vol. 82, 7952 [0120]
- Manipulation of Baculovirus Vectors. **Bailey et al.** *Methods in Molecular Biology, Volume 7: Gene Transfer and Expression Protocols.* *The Humana Press, Inc.*, 1991, vol. 7, 147-168 [0123]
- 40 • The baculovirus expression system. **Patel et al.** *DNA Cloning 2: Expression Systems.* *Oxford University Press*, 1995, 205-244 [0123]
- 45 • **Ausubel.** *Baculovirus Expression Protocols.* *The Humana Press, Inc.*, 1995, 16-3716-57 [0123]
- Insect Cell Expression Technology. **Lucknow et al.** *Protein Engineering: Principles and Practice.* *John Wiley & Sons, Inc.*, 1996, 183-218 [0123]
- 50 • **Raymond et al.** *BioTechniques*, 1999, vol. 26, 134 [0124]
- **Gleeson et al.** *J. Gen. Microbiol.*, 1986, vol. 132, 3459 [0125]
- **Raymond et al.** *Yeast*, 1998, vol. 14, 11-23 [0126]
- 55 • **Horsch et al.** *Science*, 1985, vol. 227, 1229 [0127]
- **Klein et al.** *Biotechnology*, 1992, vol. 10, 268 [0127]
- Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants. **Miki et al.** *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology.* *CRC Press*, 1993, 67-88 [0127]
- 60 • **Glick, J.** *Ind. Microbiol.*, 1987, vol. 1, 277 [0128]
- **Watson et al.** *Molecular Biology of the Gene.* 1987 [0128]
- 65 • *Molecular Biology Labfax.* *Academic Press*, 1991 [0129]
- *Bacillus Cloning Methods.* **Hardy.** *DNA Cloning: A Practical Approach.* *IRL Press*, 1985 [0129]

ES 2 334 772 T3

- Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies. **Williams et al.** DNA Cloning 2: Expression Systems. *Oxford University Press*, 1995, 15 [0131]
- Genetic Manipulation and Expression of Antibodies. **Ward et al.** Monoclonal Antibodies: Principles and Applications. *Wiley-Liss, Inc*, 1995, 137 [0131]
- Expression of Proteins in Bacteria. **Georgiou et al.** Protein Engineering: Principles and Practice. *John Wiley & Sons, Inc*, 1996, 101 [0131]
- Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture. **Etcheverry et al.** Protein Engineering: Principles and Practice. *Wiley-Liss, Inc*, 1996, 163 [0133]
- Purification of over-produced proteins from *E. Coli* cells. **Grisshammer et al.** DNA Cloning 2: Expresión Systems. *Oxford University Press*, 1995, 59-92 [0133]
- Baculovirus Expression Protocols. *The Humana Press, Inc*, 1995 [0133]
- **Merrifield.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149 [0134]
- **Stewart et al.** Solid Phase Peptide Synthesis. *Pierce Chemical Co*, 1984 [0134]
- **Bayer; Rapp.** *Chem. Pept. Prot.*, 1986, vol. 3, 3 [0134]
- **Atherton et al.** Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. *IRL Press*, 1989 [0134]
- Solid-Phase Peptide Synthesis. **Fields; Colowick.** *Methods in Enzymology. Academic Press*, 1997, vol. 289 [0134]
- **Lloyd-Williams et al.** Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins. *CRC Press, Inc*, 1997 [0134]
- **Dawson et al.** *Science*, 1994, vol. 266, 776 [0134]
- **Hackeng et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 7845 [0134]
- **Dawson.** *Methods Enzymol.*, 1997, vol. 287, 34 [0134]
- **Muir et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 6705 [0134]
- **Severinov; Muir.** *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 16205 [0134]
- Autoimmune Disease Models: A Guidebook. *Academic Press, Inc*, 1994 [0139]
- Murine Models of Spontaneous Systemic Lupus Erythematosus. **Putterman; Naparstek.** Autoimmune Disease Models: A Guidebook. *Academic Press, Inc*, 1994, 217-234 [0141]
- **Mohan et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 154, 1470 [0141]
- **Daikh et al.** *J. Immunol.*, 1997, vol. 159, 3104 [0141]
- **Weinberg et al.** *J. Immunol.*, 1999, vol. 162, 1818 [0144]
- **Mijaba et al.** *Cell. Immunol.*, 1999, vol. 186, 94 [0144]
- **Glabinski.** *Meth. Enzym.*, 1997, vol. 288, 182 [0144]
- **Wooley.** *Curr. Opin. Rheum.*, 1999, vol. 3, 407 [0146]
- **Williams et al.** *Immunol.*, 1992, vol. 89, 9784 [0146]
- **Myers et al.** *Life Sci.*, 1997, vol. 61, 1861 [0146]
- **Wang et al.** *Immunol.*, 1995, vol. 92, 8955 [0146]
- Establishment of a Mouse Model of Myasthenia gravis Which Mimics Human Myasthenia gravid Pathogenesis for Immune Intervention. **Christadoss et al.** *Immunobiology of Proteins and Peptides.* 1995, vol. III, 195-199 [0150]
- **Christadoss; Dauphinee.** *J. Immunol.*, 1986, vol. 136, 2437 [0150]

ES 2 334 772 T3

- **Lindstrom et al.** *Methods Enzymol.*, 1981, vol. 74, 432 [0150]
- Protocols in Immunology. *John Wiley & Sons*, 1997, vol. 3, 15.8.1 [0150] [0151]
- 5 • **Delgado et al.** *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1992, vol. 9, 249 [0157]
- **Duncan; Spreafico.** *Clin. Pharmacokinet.*, 1994, vol. 27, 290 [0157]
- **Francis et al.** *Int J Hematol*, 1998, vol. 68, 1 [0157]
- 10 • **Nieforth et al.** *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1996, vol. 59, 636 [0165]
- **Monkarsh et al.** *Anal. Biochem.*, 1997, vol. 247, 434 [0165]
- 15 • Affinity Chromatography: Principles & Methods. *Pharmacia LKB Biotechnology*, 1988 [0169]
- **Doonan.** Protein Purification Protocols. *The Humana Press*, 1996 [0169]
- **Sulkowski.** *Trends in Biochem.*, 1985, vol. 3, 1 [0171]
- 20 • *Meth. Enzymol.* 1990, vol. 182, 529 [0171]
- Oral Delivery of Microencapsulated Proteins. **DiBase; Morrel.** Protein Delivery: Physical Systems. *Plenum Press*, 1997, 255-288 [0189]
- 25 • **Hinchcliffe; Ilium.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999, vol. 35, 199 [0189]
- **Pettit; Gombotz.** *TIBTECH*, 1998, vol. 16, 343 [0189]
- 30 • **Patton et al.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999, vol. 35, 235 [0189]
- **Mitragotri et al.** *Science*, 1995, vol. 269, 850 [0189]
- **Potts et al.** *Pharm. Biotechnol.*, 1997, vol. 10, 213 [0189]
- 35 • Remington's Pharmaceutical Sciences. *Mack Publishing Company*, 1995 [0190]
- **Bremer et al.** *Pharm. Biotechnol.*, 1997, vol. 10, 239 [0192]
- 40 • Implants in Drug Delivery. **Ranade.** Drug Delivery Systems. *CRC Press*, 1995, 95-123 [0192]
- Protein Delivery with Infusion Pumps. **Bremer et al.** Protein Delivery: Physical Systems. *Plenum Press*, 1997, 239-254 [0192]
- 45 • Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant. **Yewey et al.** Protein Delivery: Physical System. *Plenum Press*, 1997, 93-117 [0192]
- **Bakker-Woudenberg et al.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1993, vol. 12 (1), 61 [0193]
- 50 • **Kim.** *Drugs*, 1993, vol. 46, 618 [0193]
- Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers. **Ranade.** Drug Delivery Systems. *CRC Press*, 1995, 3-24 [0193]
- 55 • **Machy et al.** Liposomes In Cell Biology And Pharmacology. John Libbey, 1987 [0193]
- **Ostro et al.** *American J. Hosp. Pharm.*, 1989, vol. 46, 1576 [0193]
- **Scherphof et al.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1985, vol. 446, 368 [0194]
- 60 • **Claassen et al.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, vol. 802, 428 [0195]
- **Allen et al.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, vol. 1068, 133 [0195]
- 65 • **Allen et al.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, vol. 1150, 9 [0195] [0199]
- **Kato et al.** *Biol. Phann. Bull.*, 1993, vol. 16, 960 [0196]

ES 2 334 772 T3

- Shimizu *et al. Biol. Pharm. Bull.*, 1997, vol. 20, 881 [0196]
- Kato; Sugiyama. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1997, vol. 14, 287 [0197]
- 5 • Murahashi *et al. Biol. Pharm. Bull.*, 1997, vol. 20, 259 [0197]
- Wu *et al. Hepatology*, 1998, vol. 27, 772 [0197]
- Kamps *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 11681 [0197]
- 10 • Harasym *et al. Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, vol. 32, 99 [0198]
- Anderson *et al. Infect. Immun.*, 1981, vol. 31, 1099 [0199]
- 15 • Anderson *et al. Cancer Res.*, 1990, vol. 50, 1853 [0199]
- Cohen *et al. Biochim. Biophys. Acta*, 1991, vol. 1063, 95 [0199]
- 20 • Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies. **Alving** *et al. Liposomes Technology. CRC Press*, 1993, vol. III, 317 [0199]
- Wassef *et al. Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 149, 124 [0199]
- Gombotz; Pettit. *Bioconjugate Chem.*, 1995, vol. 6, 332 [0200]
- 25 • Role of Polymers in Drug Delivery. **Ranade**. *Drug Delivery Systems. CRC Press*, 1995, 51-93 [0200]
- Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery. **Roskos; Maskiewicz**. *Protein Delivery: Physical Systems. Plenum Press*, 1997, 45-92 [0200]
- 30 • Bartus *et al. Science*, 1998, vol. 281, 1161 [0200]
- Putney; Burke. *Nature Biotechnology*, 1998, vol. 16, 153 [0200]
- 35 • Putney. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, vol. 2, 548 [0200]
- Gref *et al. Pharm. Biotechnol.*, 1997, vol. 10, 167 [0200]
- 40 • Ansel; Popovich. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery. Lea & Febiger*, 1990 [0202]
- Remington's *Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company*, 1995 [0202]
- Ranade; Hollinger. *Drug Delivery Systems. CRC Press*, 1996 [0202]
- 45 • Mulligan. *Science*, 1993, vol. 260, 926 [0205]
- Rosenberg *et al. Science*, 1988, vol. 242, 1575 [0205]
- LaSalle *et al. Science*, 1993, vol. 259, 988 [0205]
- 50 • Wolff *et al. Science*, 1990, vol. 247, 1465 [0205]
- Breakfield; Deluca. *The New Biologist*, 1991, vol. 3, 203 [0205]
- 55 • Kass-Eisler *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 11498 [0207]
- Kolls *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 215 [0207]
- Li *et al. Hum. Gene Ther.*, 1993, vol. 4, 403 [0207]
- 60 • Vincent *et al. Nat. Genet.*, 1993, vol. 5, 130 [0207]
- Zabner *et al. Cell*, 1993, vol. 75, 207 [0207]
- 65 • Flotte *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 10613 [0207]
- Hertz; Huang. *J. Vir.*, 1992, vol. 66, 857 [0207]

ES 2 334 772 T3

- **Raju; Huang.** *J. Vir.*, 1991, vol. 65, 2501 [0207]
- **Xiong et al.** *Science*, 1989, vol. 243, 1188 [0207]
- 5 • **Koering et al.** *Hum. Gene Yherap.*, 1994, vol. 5, 457 [0207]
- **Ozaki et al.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1993, vol. 193, 653 [0207]
- **Panicali; Paoletti.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 4927 [0207]
- 10 • **Fisher-Hoch et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 317 [0207]
- **Flexner et al.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1989, vol. 569, 86 [0207]
- 15 • **Baba et al.** *J. Neurosurg*, 1993, vol. 79, 729 [0207]
- **Ram et al.** *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 83 [0207]
- **Takamiya et al.** *J. Neurosci. Res*, 1992, vol. 33, 493 [0207]
- 20 • **Vile; Hart.** *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 962 [0207]
- **Vile; Hart.** *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 3860 [0207]
- 25 • **Lusky et al.** *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 2022 [0210]
- **Raper et al.** *Human Gene Therapy*, 1998, vol. 9, 671 [0210]
- **Amalfitano et al.** *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 926 [0210]
- 30 • **Yeh.; Perricaudet.** *FASEB J.*, 1997, vol. 11, 615 [0210]
- **Brandt et al.** *J. Gen. Virol.*, 1991, vol. 72, 2043 [0211]
- 35 • **Herold et al.** *J. Gen. Virol.*, 1994, vol. 75, 1211 [0211]
- **Visalli; Brandt.** *Virology*, 1991, vol. 185, 419 [0211]
- **Grau et al.** *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1989, vol. 30, 2474 [0211]
- 40 • **Brandt et al.** *J. Virol. Meth.*, 1992, vol. 36, 209 [0211]
- HSV Virus Protocols. *Humana Press*, 1997 [0211]
- 45 • **Feigner et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 7413 [0212]
- **Mackey et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 8027 [0212]
- **Aihara; Miyazaki.** *Nature Biotechnology*, 1998, vol. 16, 867 [0213]
- 50 • **Horton et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 1553 [0214]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. *Mack Publishing Co*, 1995 [0215]
- 55 • Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. *MacMillan Publishing Co*, 1985 [0215]
- Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice. **Jacob.** Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice. *Academic Press, Ltd*, 1994, 111-124 [0218]
- 60 • Strategies in Transgenic Animal Science. *ASM Press*, 1995 [0218]
- Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice. **Abbud; Nilson.** Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression. *Academic Press, Inc*, 1999, 367-397 [0218]
- 65 • **Menino; O'Claray.** *Biol. Reprod.*, 1986, vol. 77, 159 [0220]
- **Dienhart; Downs.** *Zygote*, 1996, vol. 4, 129 [0220]

ES 2 334 772 T3

- **Horton et al.** *Gene*, 1989, vol. 77, 61 [0232] [0251]
- **Baum et al.** *EMBO J.*, 1994, vol. 13, 3992 [0235]
- 5 • **Duncan; Winter.** *Nature*, 1988, vol. 332, 788 [0236]
- **Cogne et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1988, vol. 18, 1485 [0237]
- 10 • **Urlaub et al.** *Som. Cell. Molec. Genet.*, 1986, vol. 12, 555 [0256]

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de una proteína de fusión de activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para la fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación de células tumorales, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

(a) un resto de receptor TACI que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

10 (i) los residuos de aminoácido 34 a 104 de SEC ID N.º 2;

(ii) los residuos de aminoácido 30 a 110 de SEC ID N.º 2; y

(iii) los residuos de aminoácido 30 a 154 de SEC ID N.º 2;

15 en la que el resto de receptor TACI se une con al menos uno entre ZTNF2 o ZTNF4; y

(b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

20 2. Utilización según la reivindicación 1, en el que el medicamento comprende la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y en el que la composición farmacéutica es para su administración a un sujeto mamífero que tiene un tumor.

25 3. Utilización según la reivindicación 2 para inhibir la proliferación de linfocitos B en el sujeto mamífero.

30 4. Utilización de una proteína de fusión de activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad autoinmune, en el que la proteína de fusión e TACI-inmunoglobulina comprende:

(a) un resto de receptor TACI que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

35 (i) los residuos de aminoácido 34 a 104 de SEC ID N.º 2;

(ii) los residuos de aminoácido 30 a 110 de SEC ID N.º 2; y

(iii) los residuos de aminoácido 30 a 154 de SEC ID N.º 2;

40 en la que el resto de receptor TACI se une con al menos uno entre ZTNF2 o ZTNF4; y

(b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

45 5. Utilización según la reivindicación 4, en el que dicha enfermedad autoinmune se selecciona del grupo constituido por lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de la insulina, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil de curso poliarticular y artritis psoriática.

50 6. Utilización de una proteína de fusión de activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para la fabricación de un medicamento para tratar asma, bronquitis o enfisema, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

(a) un resto de receptor TACI que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

55 (i) los residuos de aminoácido 34 a 104 de SEC ID N.º 2;

(ii) los residuos de aminoácido 30 a 110 de SEC ID N.º 2; y

60 (iii) los residuos de aminoácido 30 a 154 de SEC ID N.º 2;

en la que el resto de receptor TACI se une con al menos uno entre ZTNF2 o ZTNF4; y

(b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

65

ES 2 334 772 T3

7. Utilización de una proteína de fusión de activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad renal, en el que la proteína de TACI-inmunoglobulina comprende:

5 (a) un resto de receptor TACI que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

(i) los residuos de aminoácido 34 a 104 de SEC ID N.º 2;

(ii) los residuos de aminoácido 30 a 110 de SEC ID N.º 2; y

10

(iii) los residuos de aminoácido 30 a 154 de SEC ID N.º 2;

en la que el resto de receptor TACI se une con al menos uno entre ZTNF2 o ZTNF4; y

15

(b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

8. Utilización según la reivindicación 7, en el que dicha enfermedad renal se selecciona del grupo constituido por insuficiencia renal en estadio terminal, glomerulonefritis, vasculitis, nefritis, amiloidosis y pielonefritis.

20

9. Utilización de una proteína de fusión de activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con inmunosupresión, rechazo de injertos, enfermedad del injerto frente al huésped, inflamación, dolor articular, hinchazón, anemia y choque séptico, en el que la proteína de TACI-inmunoglobulina comprende:

25

(a) un resto de receptor TACI que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

30

(i) los residuos de aminoácido 34 a 104 de SEC ID N.º 2;

(ii) los residuos de aminoácido 30 a 110 de SEC ID N.º 2; y

35

(iii) los residuos de aminoácido 30 a 154 de SEC ID N.º 2;

en la que el resto de receptor TACI se une con al menos uno entre ZTNF2 o ZTNF4; y

(b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

40

10. Utilización de una proteína de fusión de activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno seleccionado entre neoplasma, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de no Hodgkin, enfermedad linfoproliferativa posterior a un trasplante y gammopatía de cadena ligera, en el que la proteína de TACI-inmunoglobulina comprende:

45

(a) un resto de receptor TACI que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

50

(i) los residuos de aminoácido 34 a 104 de SEC ID N.º 2;

(ii) los residuos de aminoácido 30 a 110 de SEC ID N.º 2; y

(iii) los residuos de aminoácido 30 a 154 de SEC ID N.º 2;

55

en la que el resto de receptor TACI se une con al menos uno entre ZTNF2 o ZTNF4; y

(b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

60

11. Utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el resto de receptor TACI consta de los residuos de aminoácido 34 a 104 de SEC ID N.º 2 y en el que la proteína de fusión comprende además un segmento del tallo que consta de una serie continua de 2 a 50 residuos de aminoácido consecutivos que parte del residuo de aminoácido 105 de SEC ID N.º 2.

65

12. Utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el resto de inmunoglobulina comprende una región constante de cadena pesada.

ES 2 334 772 T3

13. Utilización según la reivindicación 12, en el que el resto de inmunoglobulina comprende una región constante de cadena pesada humana.

5 14. Utilización según la reivindicación 13, en el que la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1.

15. Utilización según la reivindicación 14, en el que el resto de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG1 que comprende los dominios C_{H2} y C_{H3}.

10 16. Utilización según la reivindicación 15, en el que el resto de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 33.

15 17. Utilización según la reivindicación 16, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 54.

18. Utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina es un dímero.

20 19. Utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el medicamento es para su administración a células cultivadas *in vitro*.

20. Proteína de fusión que comprende:

25 (a) un resto de receptor activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina (TACI), en la que el resto de receptor TACI consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

(i) los residuos de aminoácido 34 a 104 de SEC ID N.º 2;

30 (ii) los residuos de aminoácido 30 a 110 de SEC ID N.º 2; y

(iii) los residuos de aminoácido 30 a 154 de SEC ID N.º 2;

35 en la que el resto de receptor TACI se une con al menos uno entre ZTNF2 o ZTNF4; y

(b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

40 21. Proteína de fusión según la reivindicación 20, en la que el resto de receptor TACI consta de los residuos de aminoácido 34 a 104 de SEC ID N.º 2, y en la que la proteína de fusión comprende además un segmento del tallo que consta de una serie continua de 2 a 50 residuos de aminoácido consecutivos que parte del residuo de aminoácido 105 de SEC ID N.º 2.

45 22. Proteína de fusión de la reivindicación 20 ó 21, en la que el resto de inmunoglobulina comprende una región constante de cadena pesada.

23. Proteína de fusión de la reivindicación 22, en la que el resto de inmunoglobulina comprende una región constante de cadena pesada humana.

50 24. Proteína de fusión de la reivindicación 23, en la que la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1.

55 25. Proteína de fusión de la reivindicación 24, en la que el resto de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG1 que comprende los dominios C_{H2} y C_{H3}.

26. Proteína de fusión de la reivindicación 25, en la que el resto de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 33.

60 27. Proteína de fusión de la reivindicación 26, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 54.

28. Proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 20-27, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina es un dímero.

65 29. Molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 20-28.

ES 2 334 772 T3

30. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 29, en la que la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º 53.

5 31. Composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína de fusión de activador transmembrana e interaccionador con el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 54.

10 32. Composición farmacéutica según la reivindicación 31, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina es un dímero.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 334 772 T3

10 20 30 40 50
MSGLGRSRRG GRSRVDQEER FPQGLWTGVA MRSCPEEQYW DPLLGTCMSC

60 70 80 90 100
KTICNHQSQR TCAAFCRSLR CRKEQGKPYD HLLRDCISCA SIGGQHPKQC

110 120 130 140 150
AYFCENKLRS PVLNPPPELRR QRSGEVENNS DNSGRYQGLE HRGSEASPAL

160 170 180 190 200
PGLKLSADQV ALVYSTLGLC LCAVLCCFLV AVACFLKKRG DPCSCQPRSR

210 220 230 240 250
PRQSPAKSSQ DHAMEAGSPV STSPEPVETC SFCFPECRAP TQESAVTPGT

260 270 280 290
PDPTCAGRWG CHTRTTVLQP CPHIPDSGLG IVCVPAQEGG PGA

Figura 1

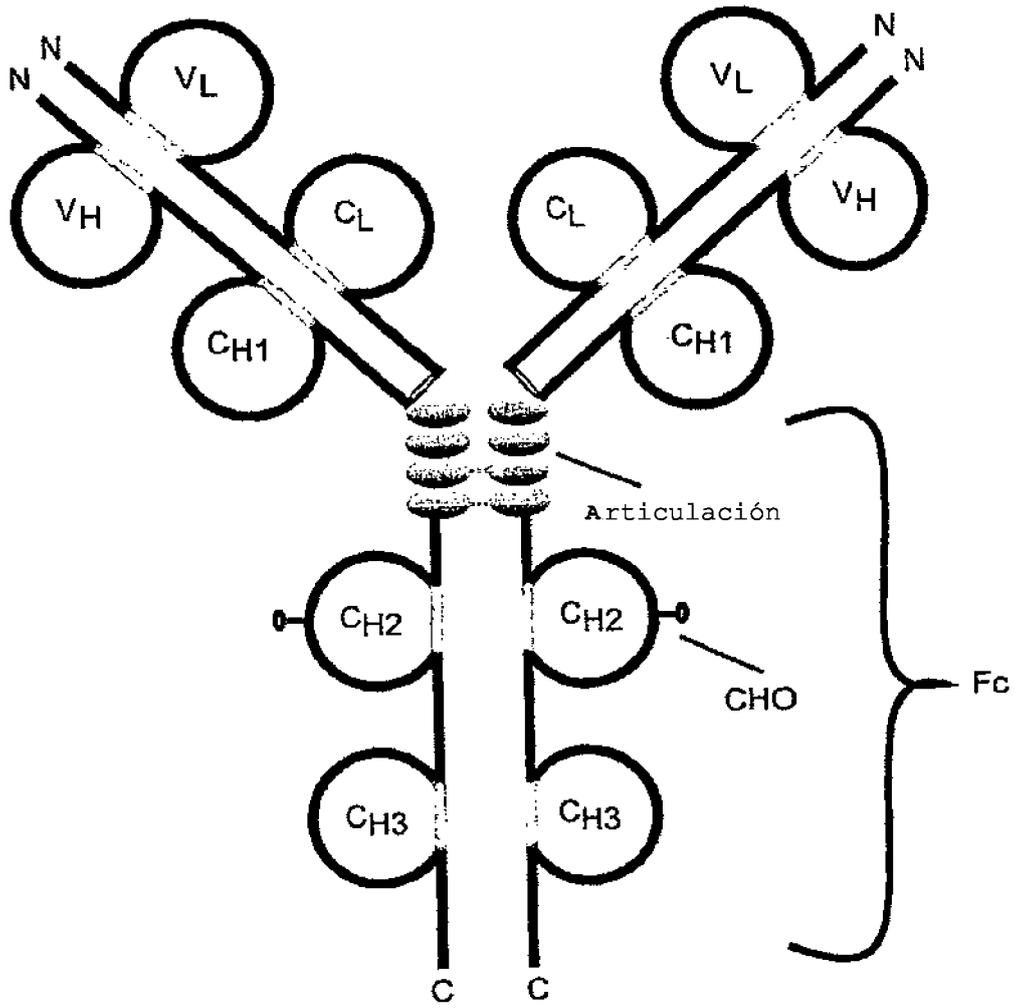


Figura 2

ES 2 334 772 T3

	LC										HC			HC	
	218		222										230		
wt	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
Fc-488	.	.	Arg	.	Ser
Fc4	.	.	Arg	.	Ser
Fc5	Ser
Fc6	Ser
Fc7
Fc8	Ser
<-articulación->															
	234		235		237								245		
wt	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
Fc-488
Fc4	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala
Fc5	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala
Fc6	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala
Fc7
Fc8
CH2 ->															
	260														
wt	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
Fc8
	275														
wt	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
Fc8

Figura 3A

ES 2 334 772 T3

	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	290 Lys
wt
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
Fc8

	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	305 Val
wt
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7	Gln
Fc8

	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	320 Lys
wt
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
Fc8

	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	330 Ala	331 Pro	Ile	Glu	Lys	335 Thr
wt
Fc-488
Fc4	Ser	Ser
Fc5	Ser	Ser
Fc6	Ser	Ser
Fc7
Fc8

Figura 3B

ES 2 334 772 T3

	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	410
wt																
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
Fc8

	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	425
wt																
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
Fc8

	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	440
wt																
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
Fc8

	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***
wt								
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6	***
Fc7
Fc8

Figura 3D

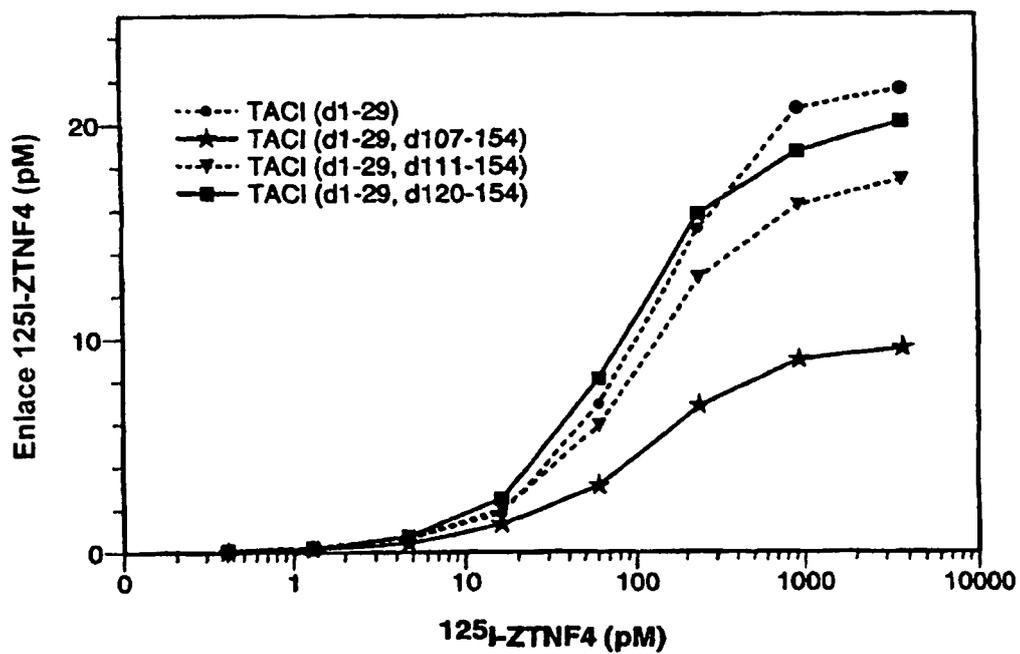


Figura 4

ES 2 334 772 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ZymoGenetics, Inc.
- 5 <120> Proteínas de fusión de TACI e inmunoglobulina
- <130> 01-20PC
- 10 <150> 60/293.343
<151> 24-05-2001
- <160> 70
- 15 <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
- <210> 1
- 20 <211> 1377
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
- 25 <220>
<221> CDS
<222> (14)...(892)
- 30 <400> 1
- agcatcctga gta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg 49
Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg
1 5 10
- 35 agc cgt gtg gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg acg ggg 97
Ser Arg Val Asp Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly
15 20 25
- 40 gtg gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg 145
Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu
30 35 40
- 45 ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc aac cat cag agc cag cgc 193
Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg
45 50 55 60
- 55
- 60
- 65

ES 2 334 772 T3

5 acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc 241
 Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly
 65 70 75

10 aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc 289
 Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile
 80 85 90

15 tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc 337
 Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu
 95 100 105

20 agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga 385
 Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly
 110 115 120

25 gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag 433
 Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu
 125 130 135 140

30 cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt 481
 His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser
 145 150 155

35 gca gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt 529
 Ala Asp Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys
 160 165 170

40 gcc gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag 577
 Ala Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys
 175 180 185

45 agg ggg gat ccc tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt 625
 Arg Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser
 190 195 200

50 ccg gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg 673
 Pro Ala Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val
 205 210 215 220

55 agc aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag 721
 Ser Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu
 225 230 235

60

65

ES 2 334 772 T3

5 tgc agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac 769
 Cys Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp
 240 245 250

10 ccc act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg 817
 Pro Thr Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu
 255 260 265

15 cag cct tgc cca cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg 865
 Gln Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val
 270 275 280

20 cct gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taaatggggg tcaggagg 912
 Pro Ala Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala
 285 290

25 aaaggaggag ggagagagat ggagaggagg ggagagagaa agagaggtgg ggagagggga 972
 gagagatatg aggagagaga gacagaggag gcagaaaggg agagaaacag aggagacaga 1032
 gagggagaga gagacagagg gagagagaga cagaggggaa gagaggcaga gagggaaga 1092
 ggcagagaag gaaagagaca ggcagagaag gagagaggca gagagggaga gaggcagaga 1152
 gggagagagg cagagagaca gagagggaga gaggacaga gagagataga gcaggaggtc 1212
 30 ggggcactct ggtcccagt tcccagtgca gctgtaggtc gtcacacct aaccacacgt 1272
 gcaataaagt cctcgtgcct gctgctcaca gccccgaga gcccctctc ctggagaata 1332
 aaacctttg cagctgcct tcctcaaaaa aaaaaaaaa aaaaa 1377

35 <210> 2
 <211> 293
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*

45
 50
 55
 60
 65

ES 2 334 772 T3

<400> 2

5 Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
 1 5 10 15
 Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
 20 25 30
 10 Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
 35 40 45
 Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
 50 55 60
 15 Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
 65 70 75 80

 20 His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
 85 90 95
 Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
 100 105 110
 25 Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
 115 120 125
 Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
 130 135 140
 30 Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
 145 150 155 160
 35 Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys
 165 170 175
 Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro
 180 185 190
 40 Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser
 195 200 205
 Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro
 210 215 220
 45 Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro
 225 230 235 240
 Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala
 245 250 255
 50 Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro
 260 265 270
 His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu
 275 280 285
 55 Gly Gly Pro Gly Ala
 290

<210> 3

<211> 285

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 334 772 T3

<400> 3

5 Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 20 25 30
 10 Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 35 40 45

 15 Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 50 55 60
 Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
 65 70 75 80
 20 Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 85 90 95
 Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 100 105 110
 25 Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 115 120 125
 Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
 130 135 140
 30 Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
 145 150 155 160
 35 Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
 165 170 175
 Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
 180 185 190
 40 Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
 195 200 205
 Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
 210 215 220
 45 Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
 225 230 235 240
 50 Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
 245 250 255
 Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
 260 265 270
 55 Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 275 280 285

<210> 4

<211> 250

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 334 772 T3

<400> 4

5 Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp
 20 25 30
 10 Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu
 35 40 45
 15 Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg
 50 55 60
 Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp
 65 70 75 80
 20 Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn
 85 90 95
 Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys
 100 105 110
 25 Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys
 115 120 125
 Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg
 130 135 140
 30 Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala
 145 150 155 160
 Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe
 165 170 175
 35 Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr
 180 185 190
 40 Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr
 195 200 205
 Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile
 210 215 220
 45 Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro
 225 230 235 240
 His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
 245 250
 50

<210> 5

<211> 762

55 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

60 <221> CDS

<222> (7)...(759)

65

ES 2 334 772 T3

<400> 5

5 ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc 48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
1 5 10

10 aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc 96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
15 20 25 30

15 cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc 144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
35 40 45

20 ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag 192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
50 55 60

25 gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag 240
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
65 70 75

30 ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag 288
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
80 85 90

35 ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc 336
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
95 100 105 110

40 acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag 384
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
115 120 125

45 gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa 432
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
130 135 140

50 gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc 480
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
145 150 155

55 cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa 528
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
160 165 170

60 ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 576

65

ES 2 334 772 T3

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 175 180 185 190

5

ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc 624
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 195 200 205

10

tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag 672
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 210 215 220

15

cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac 720
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 225 230 235

20

cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 762
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 240 245 250

25

<210> 6

<211> 251

30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

35

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 20 25 30
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 35 40 45
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 50 55 60
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 65 70 75 80
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 85 90 95
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 100 105 110
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 115 120 125

60

65

ES 2 334 772 T3

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 130 135 140
 5 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 145 150 155 160
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 165 170 175
 10 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 180 185 190
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 195 200 205
 15 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 210 215 220
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 225 230 235 240
 20 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245 250

25
 <210> 7
 <211> 44
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Cebador para PCR.

<400> 7
 40 **atcagcggaa ttcagatctt cagacaaaac tcacacatgc ccac 44**

<210> 8
 45 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador para PCR.

<400> 8
 55 **ggcagtctct agatcattta cccggagaca gggag 35**

60 <210> 9
 <211> 51
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 334 772 T3

<223> Cebador para PCR.

<400> 9

5

**ccgtgccag cacctgaagc cgagggggca ccgtcagtc
tcctctccc c**

51

10

<210> 10

<211> 31

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador para PCR.

<400> 10

25

ggattctaga ttattaccg ggagacaggg a 31

<210> 11

30 <211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador para PCR.

<400> 11

40

gggggggct cccagatggg tcctgtccga gccagatct tcagacaaa ctcac

55

45

<210> 12

<211> 18

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Cebador para PCR.

<400> 12

60

tgggagggct ttgttga 18

<210> 13

65 <211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 334 772 T3

<220>

<223> Cebador para PCR

5 <400> 13

tccaacaaag ccctcccatc ctccatcgag aaaaccatct cc 42

10 <210> 14

<211> 57

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR.

20 <400> 14

ggatggatcc atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatg

25 **57**

<210> 15

<211> 59

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador para PCR

<400> 15

40 **ctcagccagg aatccatgc cgagttgaga cgcttccgta gaatgagtgg cctgggccg**

59

45 <210> 16

<211> 48

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR.

55 <400> 16

gcattgtgta gttttgtctg aagatctggg ctcttcagc cccggggag

60 **48**

<210> 17

65 <211> 60

<212> ADN

ES 2 334 772 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador para PCR

<400> 17

10 **gcacagaggc tcagaagcaa gtccagctct cccggggctg aaggagccca gatcttcaga**

60

15 <210> 18

<211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador para PCR.

25 <400> 18

ggggtgggta caaccccaga gctgttttaa tctagattat ttaccggag acaggg

56

30

<210> 19

<211> 36

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Cebador para PCR

<400> 19

45 **gagcccaaat cttcagacaa aactcacaca tgccca**

36

<210> 20

50 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Cebador para PCR

<400> 20

60

taattggcgc gcctctagat tattaccg gagaca

36

65 <210> 21

<211> 37

<212> ADN

ES 2 334 772 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Cebador para PCR.
<400> 21

10 **ggcgcgcctc tagattaacc cggagacagg gagaggc** 37

<210> 22
15 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador para PCR

25 <400> 22

gagcccaaat cttgcgacaa aactcaca 28

30 <210> 23
<211> 33
<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR.

40 <400> 23

45 **gtacgtgctt tggactgct cctcccgcgg ctt** 33

<210> 24
<211> 28

50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Cebador para PCR

<400> 24

60 **cagtaccaa gcacgtaccg tgtgtca** 28

<210> 25
65 <211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 334 772 T3

<220>

<223> tPA líder optimizado.

5 <400> 25

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
 20 25 30
 Phe Arg Arg
 35

<210> 26

20 <211> 995

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <220>

<221> CDS

<222> (219)...(770)

30 <400> 26

aagactcaaa cttagaaact tgaattagat gtggtattca aatccttacg tgccgcgaag 60
 35 acacagacag cccccgtaag aaccacgaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct 120
 agctgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttccaggc 180
 tgtttcttct gtagctccct tgttttcttt ttgtgatc atg ttg cag atg gct ggg 236
 Met Leu Gln Met Ala Gly
 40 1 5
 cag tgc tcc caa aat gaa tat ttt gac agt ttg ttg cat gct tgc ata 284
 45 Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile
 10 15 20
 cct tgt caa ctt cga tgt tct tct aat act cct cct cta aca tgt cag 332
 50 Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln
 25 30 35

55

60

65

ES 2 334 772 T3

5 cgt tat tgt aat gca agt gtg acc aat tca gtg aaa gga acg aat gcg 380
 Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly Thr Asn Ala
 40 45 50

10 att ctc tgg acc tgt ttg gga ctg agc tta ata att tct ttg gca gtt 428
 Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val
 55 60 65 70

15 ttc gtg cta atg ttt ttg cta agg aag ata agc tct gaa cca tta aag 476
 Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile Ser Ser Glu Pro Leu Lys
 75 80 85

20 gac gag ttt aaa aac aca gga tca ggt ctc ctg ggc atg gct aac att 524
 Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu Leu Gly Met Ala Asn Ile
 90 95 100

25 gac ctg gaa aag agc agg act ggt gat gaa att att ctt ccg aga ggc 572
 Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu Ile Ile Leu Pro Arg Gly
 105 110 115

30 ctc gag tac acg gtg gaa gaa tgc acc tgt gaa gac tgc atc aag agc 620
 Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu Asp Cys Ile Lys Ser
 120 125 130

35 aaa ccg aag gtc gac tct gac cat tgc ttt cca ctc cca gct atg gag 668
 Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe Pro Leu Pro Ala Met Glu
 135 140 145 150

40 gaa ggc gca acc att ctt gtc acc acg aaa acg aat gac tat tgc aag 716
 Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys Thr Asn Asp Tyr Cys Lys
 155 160 165

45 agc ctg cca gct gct ttg agt gct acg gag ata gag aaa tca att tct 764
 Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu Ile Glu Lys Ser Ile Ser
 170 175 180

50 gct agg taattaacca tttcgactcg agcagtgcca ctttaaaaat cttttgtcag 820
 Ala Arg

55 aatagatgat gtgtcagatc tctttaggat gactgtatctt ttcagttgcc gatacagctt 880
 tttgcctctt aactgtggaa actctttatg ttgatatat tctcttaggt tactgttggg 940
 agctaatgg tagaaacttc cttggttca tgattaaagt cttttttttt cctga 995

<210> 27

60 <211> 184

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 334 772 T3

<400> 27

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

40

<210> 28

<211> 762

<212> ADN

45

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> Resto de inmunoglobulina modificado.

<221> CDS

<222> (7)...(759)

55

60

65

ES 2 334 772 T3

<400> 28

5	ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro 1 5 10	48
10	aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys 15 20 25 30	96
15	cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 35 40 45	144
20	ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 50 55 60	192
25	gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 65 70 75	240
30	ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 80 85 90	288
35	ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 95 100 105 110	336
40	acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 115 120 125	384
45	gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 130 135 140	432
50	gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser 145 150 155	480
55	cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 160 165 170	528

60

65

ES 2 334 772 T3

5 ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 576
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 175 180 185 190

10 ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc 624
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 195 200 205

15 tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag 672
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 210 215 220

20 cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac 720
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 225 230 235

25 cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 762
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 240 245 250

30 <210> 29

<211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<400> 29

40 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 20 25 30
 45 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 35 40 45
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 50 55 60
 55 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 65 70 75 80
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 85 90 95
 60 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 100 105 110
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 115 120 125

65

ES 2 334 772 T3

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 130 135 140
 5 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 145 150 155 160
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 165 170 175
 10 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 180 185 190
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 15 195 200 205
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 210 215 220
 20 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 225 230 235 240
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245 250
 25

<210> 30

<211> 762

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Resto de inmunoglobulina modificado.

<221> CDS

40 <222> (7)...(759)

<400> 30

45 ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
 1 5 10
 50 aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc 96
 Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 15 20 25 30
 55 cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc 144
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
 35 40 45
 60 ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag 192
 65

ES 2 334 772 T3

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 50 55 60
 5
 gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag 240
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 65 70 75
 10
 ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag 288
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 80 85 90
 15
 ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc 336
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 95 100 105 110
 20
 acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag 384
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 115 120 125
 25
 gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa 432
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 130 135 140
 30
 gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc 480
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 145 150 155
 35
 cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa 528
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 160 165 170
 40
 ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 576
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 175 180 185 190
 45
 ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc 624
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 195 200 205
 50
 tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag 672
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 210 215 220
 55
 60
 65

ES 2 334 772 T3

<210> 32
 <211> 762
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Resto de inmunoglobulina modificado.
 10
 <221> CDS
 <222> (7)...(759)
 15 <400> 32

```

    ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc 48
      Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
    20           1           5           10

    aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc 96
    Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
    25           15           20           25           30

    cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc 144
    Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
    30           35           40           45

    ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag 192
    Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
    35           50           55           60

    gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag 240
    Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    40           65           70           75

    ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag 288
    Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
    45           80           85           90

    ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc 336
    50
  
```

55
60
65

ES 2 334 772 T3

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 95 100 105 110

5
 acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag 384
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 115 120 125

10
 gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa 432
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 130 135 140

15
 gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc 480
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 145 150 155

20
 cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa 528
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 160 165 170

25
 ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 576
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 175 180 185 190

30
 ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc 624
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 195 200 205

35
 tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag 672
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 210 215 220

40
 cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac 720
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 225 230 235

45
 cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 762
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 240 245 250

50

<210> 33

55 <211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

65

ES 2 334 772 T3

<400> 33

5 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 20 25 30
 10 Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 35 40 45
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 50 55 60
 15 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 65 70 75 80
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 85 90 95
 20 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 100 105 110
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 115 120 125
 25 Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 130 135 140
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 145 150 155 160
 30 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 165 170 175
 35 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 180 185 190
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 195 200 205
 40 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 210 215 220
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 225 230 235 240
 45 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245 250

50 <210> 34

<211> 759

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Resto de inmunoglobulina modificado.

60

<221> CDS

<222> (7)...(756)

65

ES 2 334 772 T3

<400> 34

5	ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro	48
	1 5 10	
10	aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys	96
	15 20 25 30	
15	cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu	144
	35 40 45	
20	ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu	192
	50 55 60	
25	gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys	240
	65 70 75	
30	ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys	288
	80 85 90	
35	ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	336
	95 100 105 110	
40	acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	384
	115 120 125	
45	gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	432
	130 135 140	
50	gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	480

55

60

65

ES 2 334 772 T3

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 145 150 155

5 cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa 528
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 160 165 170

10 ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 576
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 175 180 185 190

15 ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc 624
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 195 200 205

20 tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag 672
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 210 215 220

25 cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac 720
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 225 230 235

30 cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga 759
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 240 245 250

35

<210> 35

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 35

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

50 Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 20 25 30

55 Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 35 40 45

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 50 55 60

60

65

ES 2 334 772 T3

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 65 70 75 80
 5 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 85 90 95
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 100 105 110
 10 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 115 120 125
 Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 130 135 140
 15 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 145 150 155 160
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 165 170 175
 20 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 180 185 190
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 195 200 205
 25 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 210 215 220
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 225 230 235 240
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 245 250

35

<210> 36

<211> 762

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Resto de inmunoglobulina modificado.

<221> CDS

<222> (7)...(759)

50

<400> 36

55 ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
 1 5 10

60 aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tgc gac aaa act cac aca tgc 96

65

ES 2 334 772 T3

Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 15 20 25 30
 5
 cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc 144
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 35 40 45
 10
 ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag 192
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 50 55 60
 15
 gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag 240
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 65 70 75
 20
 ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag 288
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 80 85 90
 25
 ccg cgg gag gag cag tac caa agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc 336
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 95 100 105 110
 30
 acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag 384
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 115 120 125
 35
 gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa 432
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 130 135 140
 40
 gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc 480
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 145 150 155
 45
 cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa 528
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 160 165 170
 50
 ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 576
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 175 180 185 190
 55
 60
 65

ES 2 334 772 T3

5 ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc 624
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 195 200 205

10 tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag 672
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 210 215 220

15 cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac 720
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 225 230 235

20 cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 762
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 240 245 250

25 <210> 37
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

35 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 20 25 30

40 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 35 40 45

45 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 50 55 60

50 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 65 70 75 80

55 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 85 90 95

 Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 100 105 110

60 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 115 120 125

 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 130 135 140

65 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 145 150 155 160

ES 2 334 772 T3

5 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 165 170 175
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 180 185 190
 10 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 195 200 205
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 210 215 220
 15 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 225 230 235 240
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245 250

20 <210> 38
 <211> 762
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Resto de inmunoglobulina modificado.
 30 <221> CDS
 <222> (7)...(759)
 35 <400> 38

40 ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
 1 5 10
 45 aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc 96
 Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 15 20 25 30
 50 cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc 144
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 35 40 45
 55 ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag 192
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 50 55 60
 60 gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag 240

65

ES 2 334 772 T3

	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
			65					70					75				
5	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	288
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
		80					85					90					
10	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	336
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
		95				100					105					110	
15	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	384
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
					115					120						125	
20	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	432
	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
				130					135					140			
25	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	480
	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
			145					150					155				
30	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	528
	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
		160					165					170					
35	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	576
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
						180					185					190	
40	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	624
	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
						195				200					205		
45	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	672
	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
				210						215				220			
50	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	720
	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
			225					230					235				
55	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	tga			762
	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
			240				245					250					
60																	

65 <210> 39
 <211> 251
 <212> PRT

ES 2 334 772 T3

<213> Secuencia artificial

<400> 39

5 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10
Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
10 20 25 30
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
35 40 45
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
15 50 55 60
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
65 70 75 80
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
20 85 90 95
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
100 105 110
25 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
115 120 125
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
130 135 140
30 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
145 150 155 160
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
35 165 170 175
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
180 185 190
40 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
195 200 205
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
210 215 220
45 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
225 230 235 240
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250

50

<210> 40

<211> 29

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Cebador para PCR.

<400> 40

65 .tattaggccg gccacatgg atgcaatga

29

ES 2 334 772 T3

<210> 41
<211> 29
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR.
10
<400> 41

15 **tgaagattg ggctcctga gacctggga 29**

<210> 42
<211> 29
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Cebador para PCR.

<400> 42

30 **tcccaggtct caaggagccc aaatctca 29**

<210> 43
35 <211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador para PCR

<400> 43
45

45 **tgaagattg ggctcgttct cacagaagta 30**

50 <210> 44
<211> 31
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR
60
<400> 44

65 **atattctgt gagaacgagc ccaaatttc a 31**

<210> 45

ES 2 334 772 T3

<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Cebador para PCR
10 <400> 45
ttgggctcg ctctgagct tgttcaca 30
15
<210> 46
<211> 28
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador para PCR.
25 <400> 46
30 **ctcaggagcg agcccaaate ttcagaca 28**
<210> 47
<211> 26
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
40 <223> Cebador para PCR.
<400> 47
45 **ttgggctcc ctgagctctg gtggaa 26**
50 <210> 48
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> Cebador para PCR
60 <400> 48
gagctcaggg agcccaaate ttcagaca 28
65
<210> 49
<211> 1214

ES 2 334 772 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Proteína de fusión.

<221> CDS

10 <222> (17)...(1192)

<400> 49

```

15      tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
           Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
           1             5             10

20      ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc 100
           Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
           15             20             25

25      gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag 148
           Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
           30             35             40

30      tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc 196
           Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
           45             50             55             60

35      aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc 244
  
```

40

45

50

55

60

65

ES 2 334 772 T3

	Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser	
	65 70 75	
5	tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys	292
	80 85 90	
10	atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr	340
	95 100 105	
15	ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu	388
	110 115 120	
20	agg aga cag cgg agt gga gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly	436
	125 130 135 140	
25	agg tac caa gga ttg gag cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu	484
	145 150 155	
30	cca ggt ctc aag gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca Pro Gly Leu Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro	532
	160 165 170	
35	ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe	580
	175 180 185	
40	ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	628
	190 195 200	
45	aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	676
	205 210 215 220	
50	aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	724
	225 230 235	
55		
60		
65		

ES 2 334 772 T3

5 cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc 772
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 240 245 250

10 gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc 820
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 255 260 265

15 tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc 868
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 270 275 280

20 aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg 916
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 285 290 295 300

25 gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc 964
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 305 310 315

30 ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg 1012
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 320 325 330

35 gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac gcc tcc 1060
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 335 340 345

40 ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag 1108
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 350 355 360

45 ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac 1156
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 365 370 375 380

50 tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctagag 1202
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390

gcgcgccaat ta 1214

55 <210> 50
 <211> 392

<212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión.

65

ES 2 334 772 T3

<400> 50

5 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
 20 25 30
 10 Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
 35 40 45
 Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
 50 55 60
 15 Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
 65 70 75 80
 Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
 85 90 95
 20 Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
 100 105 110
 Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg
 115 120 125
 25 Ser Gly Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly
 130 135 140
 Leu Glu His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys
 145 150 155 160
 30 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 165 170 175
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 180 185 190
 35 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 195 200 205
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 210 215 220
 40 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 225 230 235 240
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 245 250 255
 45 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 260 265 270

50

55

60

65

ES 2 334 772 T3

5 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 275 280 285
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 290 295 300
 10 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 305 310 315 320
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 325 330 335
 15 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 340 345 350
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 355 360 365
 20 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 370 375 380
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390

25 <210> 51
 <211> 1070
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión.

35 <221> CDS
 <222> (17)...(1048)

40 <400> 51

45 tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
 1 5 10
 50 ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc 100
 Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
 15 20 25
 55 gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag 148
 Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
 30 35 40
 60 tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc 196

65

ES 2 334 772 T3

Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
 45 50 55 60
 5
 aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc 244
 Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
 65 70 75
 10
 tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc 292
 Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
 80 85 90
 15
 atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac 340
 Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
 95 100 105
 20
 ttc tgt gag aac gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca 388
 Phe Cys Glu Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 110 115 120
 25
 ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc 436
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 125 130 135 140
 30
 ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc 484
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 145 150 155
 35
 aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc 532
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 160 165 170
 40
 aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg 580
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 175 180 185
 45
 cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc 628
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 190 195 200
 50
 gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc 676
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 205 210 215 220
 55
 60
 65

ES 2 334 772 T3

5	tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 225 230 235	724
10	aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 240 245 250	772
15	gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 255 260 265	820
20	ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 270 275 280	868
25	gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 285 290 295 300	916
30	ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 305 310 315	964
35	ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 320 325 330	1012
40	tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctagag Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 335 340	1058
45	gcgcgccaat ta	1070

45 <210> 52
 <211> 344
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión.

55

60

65

ES 2 334 772 T3

<400> 52

5 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
 20 25 30
 10 Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
 35 40 45
 Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
 50 55 60
 15 Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
 65 70 75 80
 Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
 85 90 95
 20 Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
 100 105 110
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 115 120 125
 25 Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 130 135 140
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 145 150 155 160
 30 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Gln Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 180 185 190
 35 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 195 200 205
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 210 215 220
 40 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 245 250 255
 45 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270
 50 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300
 55 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 325 330 335
 60 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 53

65 <211> 1082

<212> ADN

ES 2 334 772 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Proteína de fusión.

<221> CDS

<222> (17)...(1060)

10

<400> 53

```

15      tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
           Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
                1             5             10

20      ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc 100
           Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
                15             20             25

25      gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag 148
           Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
                30             35             40

30      tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc 196
           Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
                45             50             55             60

35      aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc 244
           Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
                65             70             75

40      tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc 292
           Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
                80             85             90

45      atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac 340
           Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
                95             100             105

```

50

55

60

65

ES 2 334 772 T3

ttc tgt gag aac aag ctc agg agc gag ccc aaa tct tca gac aaa act 388
 Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 5 110 115 120

cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca 436
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser
 10 125 130 135 140

gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg 484
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 15 145 150 155

acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct 532
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 20 160 165 170

gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc 580
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 25 175 180 185

aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc 628
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 30 190 195 200

agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac 676
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 35 205 210 215 220

aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc 724
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 40 225 230 235

atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg 772
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 45 240 245 250

ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc 820
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 50 255 260 265

ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc 868
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 55 270 275 280

60

65

ES 2 334 772 T3

aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac 916
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 5 285 290 295 300

 tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc 964
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 10 305 310 315

 agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct 1012
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 15 320 325 330

 ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1060
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 20 335 340 345

 taatctagag .gcgcgccaat ta 1082
 25
 <210> 54
 <211> 348
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Proteína de fusión

 <400> 54

 40 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
 45 20 25 30
 Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
 35 40 45
 Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
 50 50 55 60
 Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
 65 70 75 80
 Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
 55 85 90 95
 Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
 100 105 110

ES 2 334 772 T3

Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 115 120 125
 5 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 130 135 140
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 10 145 150 155 160
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 165 170 175
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 15 180 185 190
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 195 200 205
 20 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 210 215 220
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 225 230 235 240
 25 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 245 250 255
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 30 260 265 270
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 275 280 285
 35 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 290 295 300
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 305 310 315 320
 40 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 325 330 335
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345
 45

<210> 55

<211> 1109

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

<221> CDS

<222> (17)...(1090)

65

ES 2 334 772 T3

<400> 55

5 tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
 1 5 10

10 ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc 100
 Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
 15 20 25

15 gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag 148
 Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
 30 35 40

20 tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc 196
 Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
 45 50 55 60

25 aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc 244
 Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
 65 70 75

30 tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc 292
 Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
 80 85 90

35 atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac 340
 Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
 95 100 105

40 ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc 388
 Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu
 110 115 120

45 agg gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca 436
 Arg Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 125 130 135 140

50 gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa 484
 Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 145 150 155

55 ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg 532

60

65

ES 2 334 772 T3

	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	
	160 165 170	
5	gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac 580	
	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	
	175 180 185	
10	gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag 628	
	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	
	190 195 200	
15	cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac 676	
	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	
	205 210 215 220	
20	cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa 724	
	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
	225 230 235	
25	gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag 772	
	Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
	240 245 250	
30	ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg 820	
	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu	
	255 260 265	
35	acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc 868	
	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	
	270 275 280	
40	agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac 916	
	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	
	285 290 295 300	
45	tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc 964	
	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
	305 310 315	
50	tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc 1012	
	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	
	320 325 330	
55	ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag 1060	
	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	
	335 340 345	
60	aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa tctagaggcg cgccaatta 1109	
	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *	
	350 355	
65		

ES 2 334 772 T3

<210> 56

<211> 357

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

10

<400> 56

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

50

55

60

65

ES 2 334 772 T3

<211> 586

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5

<220>

<221> CDS

<222> (27)...(578)

10

<400> 59

```

gcagcttgtag cggcggcgtag ggcacc atg agg cga ggg ccc cgg agc ctg cgg 53
Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg
1 5

ggc agg gac gcg cca gcc ccc acg ccc tgc gtc ccg gcc gag tgc ttc 101
Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe
10 15 20 25

gac ctg ctg gtc cgc cac tgc gtg gcc tgc ggg ctc ctg cgc acg ccg 149
Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro
30 35 40

cgg ccg aaa ccg gcc ggg gcc agc agc cct gcg ccc agg acg gcg ctg 197
Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu
45 50 55

cag ccg cag gag tcg gtg ggc gcg ggg gcc ggc gag gcg gcg ctg ccc 245
Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro
60 65 70

ctg ccc ggg ctg ctc ttt ggc gcc ccc gcg ctg ctg ggc ctg gca ctg 293
Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu
75 80 85

gtc ctg gcg ctg gtc ctg gtg ggt ctg gtg agc tgg agg ccg cga cag 341
Val Leu Ala Leu Val Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln
90 95 100 105

cgg ccg ctt cgc gcc gcg tcc tcc gca gag gcc ccc gac gga gac aag 389

```

55

60

65

ES 2 334 772 T3

Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys
 110 115 120
 5 gac gcc cca gag ccc ctg gac aag gtc atc att ctg tct ccg gga atc 437
 Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile
 125 130 135
 10 tct gat gcc aca gct cct gcc tgg cct cct cct ggg gaa gac cca gga 485
 Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly
 140 145 150
 15 acc acc cca cct ggc cac agt gtc cct gtg cca gcc aca gag ctg ggc 533
 Thr Thr Pro Pro Gly His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly
 155 160 165
 20 tcc act gaa ctg gtg acc acc aag acg gcc ggc cct gag caa caa 578
 Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 170 175 180
 tagcaggg 586
 30 <210> 60
 <211> 184
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 60
 40 Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
 20 25 30
 45 Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
 35 40 45
 50 Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly
 50 55 60
 Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly
 65 70 75 80
 55 Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val
 85 90 95
 60 Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser
 100 105 110

65

ES 2 334 772 T3

Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp
 115 120 125
 5 Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala
 130 135 140
 Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser
 145 150 155 160
 10 Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr
 165 170 175
 Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 15 180

<210> 61
 20 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia señal de la V_H de 26-10.
 30 <400> 61

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

<210> 62
 40 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Proteína de fusión.
 50 <400> 62

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 55 Val Leu Ser Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
 20 25 30
 Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
 35 40 45
 60 Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
 50 55 60

65

ES 2 334 772 T3

5 Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
 65 70 75 80
 Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
 85 90 95
 10 Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 115 120 125
 15 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 130 135 140
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 145 150 155 160
 20 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 165 170 175
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 180 185 190
 25 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 195 200 205
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 210 215 220
 30 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 225 230 235 240
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 245 250 255
 35 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 260 265 270
 40 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 275 280 285
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 290 295 300
 45 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 305 310 315 320
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 50

<210> 63

<211> 51

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> 5'-UTR de la V_H de 26-10.

<400> 63

65 aacatatgtc caatgtcctc tocacagaca ctgaacacac tgactccaac g

ES 2 334 772 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Proteína de fusión.

<400> 67

10	aacatatgtc caatgtcctc tccacagaca ctgaacacac tgactccaac gatgggatgg	60
	agctggatct ttctctttct tctgtcagga actgcaggta aggggctccc cagttccaaa	120
	atctgaagaa aagaaatggc ttgggatgtc acagatatcc actctgtctt tctcttcaca	180
	gggtgcctct ctgctatgag atcctgcccc gaagagcagt actgggatcc tctgctgggt	240
15	acctgcatgt cctgcaaaac catttgcaac catcagagcc agcgcacctg tgcagccttc	300
	tgcaggtcac tcagctgccg caaggagcaa ggcaagttct atgaccatct cctgaggggac	360
	tgcatcagct gtgcctccat ctgtggacag caccctaagc aatgtgcata cttctgtgag	420
	aacaagctca ggagcgagcc caaatcttca gacaaaactc acacatgcc accgtgccca	480
20	gcacctgaag ccgagggggc accgtcagtc ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc	540
	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac	600
	cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	660
	ccgcggggagg agcagtacia cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	720
25	caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccatcc	780
	tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	840
	ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtea gcctgacctg cctgggtcaaa	900
	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	960
30	tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc	1020
	accgtggaca agagcagggt gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	1080
	gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa ataaa	1135

35

<210> 68

<211> 1135

<212> ADN

40

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Proteína de fusión

<400> 68

50	aacatatgtc caatgtcctc tccacagaca ctgaacacac tgactgccac catgggatgg	60
	agctggatct ttctctttct tctgtcagga actgcaggta aggggctccc cagttccaaa	120

55

60

65

ES 2 334 772 T3

	atctgaagaa aagaaatggc ttgggatgtc acagatatcc actctgtctt tctcttcaca	180
	ggtgtcctct ctgctatgag atcctgcccc gaagagcagt actgggatcc tctgctgggt	240
5	acctgcatgt cctgcaaac catttgcaac catcagagcc agcgcacctg tgcagccttc	300
	tgcaggtcac tcagctgccg caaggagcaa ggcaagttct atgaccatct cctgagggac	360
	tgcatacagct gtgctccat ctgtggacag caccctaagc aatgtgcata cttctgtgag	420
	aacaagctca ggagcgagcc caaatcttca gacaaaactc acacatgcc accgtgcca	480
10	gcacctgaag ccgagggggc accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	540
	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtg tggacgtgag ccacgaagac	600
	cctgaggta agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	660
	ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	720
15	caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccatcc	780
	tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	840
	ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggta gcctgacctg cctggtcaaa	900
	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	960
20	tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctca cagcaagctc	1020
	accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	1080
	gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa ataaa	1135

25 <210> 69

<211> 884

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Constructo promotor de la LTR del MPSV/potenciador del CMV.

35 <400> 69

	cgcgttacat aacttacggt aaatggcccc cctggctgac cgcccaacga cccccccca	60
	ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt	120
40	caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg	180
	ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcttgga ttatgccag	240
	tacatgacct tatgggaact tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgtatt	300
	accatgggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg	360
45	ggatttccaa gtctccacc cttgacgtc aatgggagtt tgttttgaat gaaagacccc	420
	acctgtaggt ttggcaagct agcttaagta acgccatttg caaggcatgg aaaaatacat	480
	aactgagaat agagaagttc agatcaaggt caggaacaga gaaacaggag aatatgggcc	540
	aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccgctcag ggccaagaac agttggaaca	600
50	ggagaatatg ggccaaacag gatatactgt gtaagcagtt cctgccccgc tcagggccaa	660
	gaacagatgg tccccagatc ggtccccgcc tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt	720
	tccaggggtgc cccaaggacc tgaatgacc ctgtgcctta ttgaaactaa ccaatcagtt	780
	cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tccccgagct caataaaga gccacaacc	840
55	cctcactcgg cgcgccagtc ctccgataga ctgcgtcgcc cggg	884

<210> 70

<211> 455

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Promotor de la LTR del MPSV sin la región de control negativo.

65

ES 2 334 772 T3

<400> 70

	aatgaaagac	cccacctgta	ggtttgcaa	gctagaaggt	taggaacaga	gagacagcag	60
5	aatatgggcc	aaacaggata	tctgtggtaa	gcagttcctg	ccccggctca	gggccaagaa	120
	cagatgggcc	ccagatgcgg	tcccgccctc	agcagtttct	agagaacat	cagatgtttc	180
	cagggtgcc	caaggacctg	aaaatgacct	tgtgccttat	ttgaactaac	caatcagttc	240
	gcttctcgt	tctgttcgcg	cgcttctgct	ccccgagctc	aataaaagag	cccacaacct	300
10	ctcactcggc	gcgccagtcc	tccgatagac	tgcgtcgcgc	gggtaccctg	gttctcaata	360
	aacctcttg	cagttgcctc	cgactcgtgg	tctcgtgttt	ccttgggagg	gtctcctctg	420
	agtgattgac	taccctcag	cggggtctt	tcagt			455

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65