



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 218**

51 Int. Cl.:
C07K 14/735 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06828004 .9**
96 Fecha de presentación : **13.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1960427**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **Polipéptidos y poliméricos para los receptores Fc.**

30 Prioridad: **13.12.2005 US 750301 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2011

73 Titular/es: **SUPREMOL GmbH**
Am Klopferspitz 19
82152 Martinsried, DE

72 Inventor/es: **Hogarth, Phillip, Mark y**
Wines, Bruce, David

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 359 218 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

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a polipéptidos poliméricos solubles del receptor Fc que pueden inhibir los receptores Fc γ de leucocitos (Fc γ R) y a las interacciones con inmunoglobulina G (IgG). Dichos polipéptidos resultan útiles en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, en particular las enfermedades inflamatorias mediadas por inmunocomplejos tales como la artritis reumatoide (AR), púrpura trombocitopénica inmune (PTI) y lupus eritematoso diseminado (LED).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El tratamiento de las enfermedades inflamatorias autoinmunitarias y otras tales como AR y LED ha entrado en una fase nueva y excitante, en la que la creciente comprensión de las moléculas implicadas en el sistema inmunitario ha permitido la inhibición específica de las moléculas inflamatorias clave como el factor α de necrosis tumoral (FNT α) e interleucina 1 β (IL-1 β). Por ejemplo, en estudios recientes, se ha demostrado que los anticuerpos pueden ejercer un papel importante en la patogénesis de la AR, y en ensayos clínicos en seres humanos, las respuestas positivas a la utilización de la terapia con anticuerpos monoclonales (MAb) anti-CD20, para eliminar los linfocitos B productores de anticuerpos han generado pruebas sólidas de la importante función de los anticuerpos en la AR (Emery *et al.*, 2001). Dado que los receptores Fc (FcR) desempeñan una función fundamental en los sistemas efectores a base de inmunoglobulinas, la inhibición de la función del FcR puede proporcionar la base de una terapia eficaz para diversas enfermedades. Por otra parte, ya que los receptores Fc γ (Fc γ R) son fundamentales para los sistemas efectores de la IgG, dirigir la interacción entre los Fc γ R de leucocitos y los anticuerpos proporciona una nueva oportunidad de intervención terapéutica en la AR (Nabbe *et al.*, 2003). Una estrategia para lograr dicha intervención interesante en el contexto de la presente invención es la utilización de una forma soluble de una Fc γ R para actuar como un "señuelo" para evitar la activación de leucocitos por anticuerpos.

Los receptores Fc (FcR) son glucoproteínas de superficie de los leucocitos que se unen específicamente al fragmento Fc de los anticuerpos. Los receptores para la IgG, es decir Fc γ R, son los más extendidos y diversos, siendo los principales tipos Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16).

Los complejos inmunitarios (CI) que se forman *in vivo* en las respuestas inmunitarias normales, y los que se observan en la patología de las enfermedades autoinmunitarias tales como la AR, pueden enlazar simultáneamente muchos Fc. Por ejemplo, en los seres humanos, los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos activados pueden expresar Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb y Fc γ RIII (Takai, 2002). Sin embargo, de entre éstos, el Fc γ RIIa es el iniciador principal de la inflamación mediada por IC y, si bien todos los tipos de Fc γ R enlazan la región en la bisagra inferior del dominio Fc de la IgG de y los dominios CH2 de tal manera que cualquier polipéptido señuelo Fc γ R soluble puede inhibir la unión de IgG a todas las clases de Fc γ R, se ha apreciado que dado que Fc γ RIIa presenta la mayor especificidad de unión y la mayor selectividad para la IgG ávida de unión de inmunocomplejos, el desarrollo y la investigación de un Fc γ RIIa soluble ofrece el mayor potencial.

El documento WO-A2 2004/062619 y Li P. *et al.* (2001) dan a conocer proteínas de fusión homodiméricas de las regiones de unión a Fc fusionada cada una a un dominio bisagra de IgG₂. La dimerización de estas proteínas de fusión se produce mediante puentes disulfuro entre dominios bisagra.

De hecho, los estudios previos han demostrado que un simple polipéptido Fc γ RIIa recombinante soluble (monómero Fc γ RIIars), constituido por ectodominios Fc γ RIIa (Ierino *et al.*, 1993a), puede inhibir evidentemente la inflamación mediada por IC. En estos estudios, se probó Fc γ RIIars usando la reacción de Arthus, en la que se forman complejos inmunitarios en la dermis por administración pasiva de anticuerpos y antígenos (Pflum *et al.*, 1979), que es un modelo de vasculitis (una complicación extraarticular en la artritis) y también se produce en el LED. Se observó que mientras que el monómero Fc γ RIIars inhibía la inflamación y la infiltración de neutrófilos cuando se administra conjuntamente con el anticuerpo y el antígeno, se requerían grandes cantidades de monómero Fc γ RIIars debido a un nivel relativamente bajo de la selectividad de los inmunocomplejos. Para superar este problema, se propone utilizar una forma polimérica del señuelo Fc γ RIIars, y se ha descubierto, desde luego sorprendentemente, que no sólo dicha forma polimérica podría expresarse con éxito, presenta creciente selectividad por inmunocomplejos. Tales polipéptidos Fc γ RIIars poliméricos por lo tanto resultan muy prometedores para el tratamiento de enfermedades inflamatorias mediadas por IC tales como AR y LES.

SUMARIO DE LA INVENCION

Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína o polipéptido polimérica/o soluble que puede inhibir la interacción de los receptores Fc γ de leucocitos (Fc γ R) e inmunoglobulina G (IgG), comprendiendo dicha proteína o polipéptido dos regiones de unión a Fc, por lo menos una de las cuales procede de un receptor de tipo Fc γ R.

Preferentemente, la proteína o polipéptido es un polímero de una región de unión a Fc procedente de un receptor de tipo Fc γ RII, en particular Fc γ RIIa. Dicha molécula puede considerarse que es un homopolímero, y una

molécula especialmente preferida de este tipo es un homodímero de una región de unión a Fc procedente de un receptor de tipo FcγRII. Sin embargo, la presente invención comprende asimismo que la molécula sea un polímero de una región de unión a Fc procedente de un receptor de tipo FcγR (por ejemplo, un receptor de tipo FcγRII) y una región de unión a Fc de otra fuente (por ejemplo, una región de unión a Fc de otro tipo de receptor o un polipéptido que se une a un Fc sintético). Una molécula de este tipo puede considerarse como un heteropolímero, y una molécula especialmente preferida de este tipo es un heterodímero de una región de unión a Fc procedente de un receptor de tipo FcγRII y una región de unión a Fc procedente de un receptor de tipo FcγRIII.

Las regiones de unión a Fc están unidas por un enlace peptídico o por una secuencia enlazadora corta (por ejemplo, un solo aminoácido o un péptido corto, por ejemplo, de 2 a 20 aminoácidos de longitud).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una molécula de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o polipéptido polimérica/o soluble según el primer aspecto.

La molécula de polinucleótido puede estar constituida por un casete de expresión o un vector de expresión (por ejemplo, un plásmido para su introducción en una célula hospedadora bacteriana, o un vector vírico tal como un vector de baculovirus para la transfección de una célula hospedadora de insectos, o un plásmido o vector vírico, tal como un lentivirus para la transfección de una célula hospedadora de mamífero).

Por tanto, en un tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora recombinante que contiene una molécula de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o polipéptido polimérica/o soluble según el primer aspecto.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una proteína o polipéptido, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- (i) proporcionar una célula hospedadora recombinante que contiene una molécula de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o polipéptido polimérica/o soluble según el primer aspecto,
- (ii) cultivar dicha célula hospedadora en un medio de cultivo adecuado y en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína o polipéptido polimérica/o soluble, y
- (iii) aislar dicha proteína o polipéptido polimérica/o soluble del medio de cultivo.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un paciente para una enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho paciente una proteína o polipéptido polimérica/o soluble según el primer aspecto opcionalmente en combinación con un vehículo o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 proporciona la secuencia de nucleótidos (y la secuencia traducida de aminoácidos) para un montaje de homodímero de cabeza a cola de dos regiones FcγRIIIa extracelulares que comprende cada una ambos ectodominios FcγRIIIa, a saber, ectodominios 1 y 2. Los ectodominios 1 y 2 de FcγRIIIa están constituidos los aminoácidos 1 a 174 de la secuencia polipeptídica FcγRIIIa comprendiendo el dominio los aminoácidos 1 a 88 y comprendiendo el dominio 2 los aminoácidos 89 a 174 (Hibbs *et al.*, 1988; Homo sapiens Fc fragment of IgG, low affinity IIIa receptor (CD32) (FCGR2A), RNAm, nº de registro 021642; y Powell *et al.*, 1999). En la figura, los aminoácidos 1 a 182 proceden de la región extracelular de FcγRIIIa, de la que los aminoácidos 1 a 174 comprenden el ectodominios FcγRIIIa 1 y 2 y los aminoácidos 175 a 182 comprenden el pedúnculo proximal de la membrana (que en FcγRIIIa une el ectodominios 1 y 2 a la secuencia transmembranaria). La primera de las regiones FcγRIIIa extracelular que comprende el dímero, se compone por tanto de los aminoácidos 1 a 182 y la segunda de las regiones FcγRIIIa extracelular se compone de los aminoácidos 184 a 362 (correspondiente a los aminoácidos 3 a 182 de FcγRIIIa). El aminoácido subrayado representa un resto de aminoácido enlazador distinto de FcγRIIIa, mientras que los aminoácidos en negrita destacan una etiqueta His₆ en el terminal C.

La figura 2 representa un análisis de inmunotransferencia Western de formas poliméricas de FcγRIIIa recombinantes solubles (rs). El dímero de FcγRIIIars fue sustancialmente estable, con sólo una pequeña cantidad de producto de descomposición del monómero FcγRIIIars evidente. Por otra parte, las formas trimérica y tetramérica de FcγRIIIars eran inestables, degradándose substancialmente a la forma dimérica de FcγRIIIars. Esta degradación puede evitarse mediante la utilización de inhibidores de proteasa durante la producción o si no modificando la secuencia de las formas poliméricas a fin de eliminar punto(s) de corte.

La figura 3 representa una SDS-PAGE teñida con Coomassie (gel de acrilamida al 12%, en condiciones no reductoras) de las fracciones recogidas de la purificación del monómero FcγRIIIars (expresadas en células de mamífero) que tiene el tamaño esperado de ~30 kDa (a), y dímero de FcγRIIIars que tiene el tamaño esperado de ~50 kDa (b).

La figura 4 representa gráficamente las respuestas de unión en equilibrio del monómero FcγRIIIars al monómero de IgG inmovilizado (a) (Sandoglobulina) y (b) el modelo de inmunocomplejo, IgG agregada térmicamente (HAGG).

La figura 5 representa gráficamente las respuestas de de unión en equilibrio del dímero de FcγRIIars al monómero de IgG inmovilizado (a) (Sandoglobulina) y (b) el modelo de inmunocomplejo, HAGG.

La figura 6 representa un diagrama del monómero FcγRIIars (a) y del dímero de FcγRIIars (b) líquido se une al monómero de IgG humano inmovilizado (Sandoglobulina) después de la reacción anterior en solución con monómero de IgG humano (Sandoglobulina) y dímero-IgG (Wright *et al.*, 1980), según se determinó utilizando un protocolo analítico BIAcore normalizado.

La figura 7 proporciona diagramas de (a) la inhibición de dímero-IgG (Wright *et al.*, 1980) que se une a neutrófilos humanos (V5 voluntario) por monómero FcγRIIars purificado y dímero de FcγRIIars calculada como porcentaje de la actividad de enlace dímero-IgG desinhibida y (b) la inhibición del enlace dímero-IgG para neutrófilos humanos (voluntario V1) por el dímero de FcγRIIars purificado calculado como porcentaje de dímero que se une a dímero-IgG.

La figura 8 proporciona en (a), un diagrama de la secreción del FNT estimulada por inmunocomplejos (dímero-IgG) de MDM humanos diferenciados 24 horas (V5 voluntario) en ausencia y presencia de dímero de FcγRIIars (en el sobrenadante de 2,5 µg/ml), mientras que en (b), proporciona un diagrama de la secreción del FNT estimulada por inmunocomplejos (dímero-IgG) de MDM humanos diferenciados 24 horas (voluntarios V1), en ausencia y presencia del dímero de FcγRIIars (2,5 µg/ml).

La figura 9 proporciona un diagrama de la activación estimulada por inmunocomplejos (HAGG) de plaquetas humanas, medida por intensidad de fluorescencia media (IFM) de la expresión de P-selectina en ausencia y presencia del dímero de FcγRIIars (30 µg/ml).

La figura 10 proporciona resultados del análisis del dímero de FcγRIIars aislado de células CHO-S transfectadas de forma estable por SDS-PAGE en (a) condiciones no reductoras y (b) reductoras, (c) inmunotransferencia Western utilizando un anticuerpo anti-FcγRIIa, y (d) HPLC. El dímero de FcγRIIars migra como una banda única al peso molecular esperado (~50 kD), reacciona con el anticuerpo anti-FcγRIIa y tenía >96% de pureza determinada por HPLC.

La figura 11 proporciona un diagrama de la unión del inmunocomplejo (HAGG) a FcγRIIb humano expresado en la superficie celular (en la estirpe celular IIA1.6 de linfoma B murino) en presencia de monómero FcγRIIars o dímero de FcγRIIars.

La figura 12 proporciona un diagrama de plaquetas activadas (positivas tanto para CD41 como para CD62P) después del tratamiento con HAGG en la presencia de monómero FcγRIIars o dímero de FcγRIIars, como porcentaje de plaquetas activadas después del tratamiento con HAGG solo.

La figura 13 proporciona un diagrama de la liberación de FNT-α de células MC/9 después de la incubación con inmunocomplejos OVA en presencia de monómero FcγRIIars o dímero de FcγRIIars, como porcentaje del FNT-α liberado en presencia de inmunocomplejos OVA solos.

La figura 14 representa el análisis de inmunotransferencia Western de proteínas de fusión FcγRIIars. (1) monómero FcγRIIars, (2) dímero de FcγRIIars, (3) monómero FcγRIIars fusionado a IgG₁-Fcγ1 (L234A, L235A), (4) dímero de FcγRIIars fusionado a IgG₁-Fcγ1 (L234A, L235 A), (5) monómero FcγRIIars fusionado a albúmina de suero humano (ASH), (6) dímero de FcγRIIars fusionado a ASH; (7) monómero FcγRIIars estándar purificada, y (8) dímero de FcγRIIars estándar purificado.

La figura 15 proporciona los resultados de un ELISA para captura de HAGG con monómero FcγRIIars y fusiones del dímero de FcγRIIars. (a) monómero FcγRIIa estándar (Powell *et al.*, 1999) a partir de 0,75 µg/ml (monómero estándar); proteína de células transfectadas con montaje de monómero FcγRIIars (transfección 426 (monómero)); proteína de células transfectadas con la fusión de monómero FcγRIIars al montaje IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) (monómero-Fc); y proteínas de células transfectadas con la fusión del monómero FcγRIIars al montaje de ASH (ASH-monómero); (b) dímero de FcγRIIars estándar a partir de 0,5 µg/ml (dímero estándar); sobrenadante de células transfectadas con dímero de FcγRIIars (transfección 427 (dímero)); sobrenadante de células transfectadas con fusión del dímero de FcγRIIars a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A (dímero-Fc); y sobrenadante de células transfectadas con la fusión del dímero de FcγRIIars a ASH (ASH-dímero).

La figura 16 proporciona los resultados obtenidos a partir de un ELISA para captura de TAG sobre proteínas de fusión monómero FcγRIIars y dímero de FcγRIIars para confirmar la presencia de epítomos que demuestran que el receptor esté correctamente plegado. (A) monómero estándar FcγRIIars a partir de 0,75 µg/ml (monómero estándar); sobrenadante de las células transfectadas con monómero FcγRIIars (transfección 426 (monómero)); sobrenadante de las células transfectadas con fusión del monómero FcγRIIars a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) (monómero-Fc); y sobrenadante de las células transfectadas con fusión de monómero FcγRIIars a ASH (ASH-monómero), (B) dímero de FcγRIIars estándar (preparado internamente) a partir de 0,5 µg/ml; sobrenadante de las células transfectadas con dímero de FcγRIIars (transfección 427 (dímero)); sobrenadante de las células transfectadas con la fusión del dímero de FcγRIIars a IgG Fcγ1 (L234A, L235A) (dímero-Fc); y sobrenadante de células transfectadas con fusión del dímero de

FcγRIIars a ASH (ASH-dímero).

La figura 17 representa un diagrama esquemático de (a) monómero FcγRIIars; (b) dímero de FcγRIIars; (c) un dímero de una fusión del monómero FcγRIIars a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A), en el que la dimerización se efectúa a través de los dominios Fc de los polipéptidos por fusión del monómero FcγRIIars, proporcionando una molécula que presenta dos regiones de unión a Fc (es decir, una proteína que es dimerica para la región de unión a Fc o, de lo contrario, tiene una "valencia de dos"); (d) un dímero de la fusión del dímero de FcγRIIars a IgG -Fcγ1 (L234A, L235A), en el que la dimerización se efectúa a través de los dos dominios Fc de los polipéptidos de fusión del dímero de FcγRIIars, proporcionando una molécula que presenta cuatro regiones de unión a Fc (es decir, una proteína que es tetramérica para la región de unión a Fc o, de lo contrario, tiene una "valencia de cuatro"); (e) fusión del monómero FcγRIIars a ASH; y (f) fusión del dímero de FcγRIIars a ASH. En la figura, D1 y D2 hacen referencia, respectivamente, a los ectodominios 1 y 2, la barra llena representada junto a D2 representa una secuencia enlazadora, el bucle oscuro en la parte superior de los dominios Fc dimerizados en (c) y (d) representa enlaces disulfuro, y H₆ se refiere a la etiqueta His.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una proteína o polipéptido polimérica/o soluble que puede inhibir la interacción de los receptores Fcγ de leucocitos (FcγR) e inmunoglobulina G (IgG), que comprende dos regiones de unión a Fc, por lo menos una de las cuales procede esencialmente de un receptor tipo FcγR. Dicha proteína o polipéptido ofrece un aumento en la selectividad para inmunocomplejos respecto al observado previamente con polipéptidos monoméricos solubles tal como el monómero de rsFcγRII, y por lo tanto resulta muy prometedor como molécula "señuelo" para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria mediada por IC tales como la AR y el LED.

En un primer aspecto, la presente invención por lo tanto proporciona una proteína o polipéptido polimérica/o soluble que puede inhibir la interacción de los receptores Fcγ (FcγR) de leucocitos y de inmunoglobulina G (IgG), comprendiendo dicha proteína o polipéptido dos regiones de unión a Fc unidas, por lo menos una de las cuales procede de un receptor tipo FcγR.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "soluble" indica que la proteína o polipéptido que no está unida a una membrana celular, y está, por consiguiente, caracterizada por la ausencia o alteración funcional de todo o una parte sustancial del dominio transmembranario (es decir, lipófilo), de modo que el receptor soluble está desprovisto de cualquier función de anclaje de la membrana. Los dominios citoplasmáticos también pueden faltar.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "región de unión a Fc" hace referencia a cualquier parte o partes de un receptor Fc que puede unirse a un dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un fragmento Fc producido por hidrólisis en papaína de una molécula de inmunoglobulina), incluyendo versiones genéticamente modificadas del mismo, así como polipéptidos sintéticos que se unen a Fc.

Por lo menos una región de unión a Fc procedente de un receptor tipo FcγR puede modificarse, por ejemplo, a partir de un FcγR tener baja afinidad para la IgG, es decir una afinidad para IgG inferior a $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Dichos receptores de baja afinidad incluyen los receptores tipo FcγRII (por ejemplo, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIc), receptores tipo FcγRIII (por ejemplo FcγRIIIa y FcγRIIIb), formas truncadas de los receptores tipo FcγRI (por ejemplo, FcγRIa y FcγRIb) tales como los polipéptidos truncados que comprenden el primer y el segundo de los tres ectodominios de un receptor FcγRI (Hulett *et al.*, 1991; Hulett *et al.*, 1998), y versiones modificadas genéticamente de FcγR que normalmente tienen gran afinidad por la IgG, pero en virtud de las modificaciones (por ejemplo, una o más sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos) presentan una afinidad reducida por la IgG inferior a $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Preferentemente, la proteína o polipéptido es un homopolímero de una región de unión a Fc procedente de un receptor de FcγR como un FcγR de baja afinidad. Una región de unión a Fc adecuada consiste en la totalidad o una parte que se une a Fc parte o partes de uno o más ectodominios de un receptor FcγR. Los expertos en la materia podrán identificar sin dificultad los ectodominios que se unen a Fc de los receptores FcγR ya que estos dominios pertenecen a la superfamilia de dominio IgG (Hulett *et al.*, 1994, Hulett *et al.*, 1995, Hulett *et al.*, 1998, y Tamm *et al.*, 1996) y se caracterizan por lo general por "un sandwich de triptófano" (por ejemplo restos W90 y W113 de FcγRIIa) y otros restos (por ejemplo, en FcγRIIa, restos del ectodominio 1 y enlazador del ectodominio 2, y el BC (W113-V119), C'E (F132-P137) y FG (G159-Y160) bucles del de ectodominio 2 (Hulett *et al.*, 1994)).

Más preferentemente, la proteína o polipéptido es un homopolímero de una región de FcγRIIa que se une a Fc. Una región adecuada que se une a Fc de FcγRIIa está constituida por la totalidad o una parte que se une a Fc o partes de los ectodominios 1 y 2 de FcγRIIa. Los ectodominios 1 y 2 de FcγRIIa se encuentran dentro de los aminoácidos 1 a 172 de la secuencia de aminoácidos de FcγRIIa (Hibbs *et al.*, 1988, y n° de registro 021642). Un ejemplo de una parte de los ectodominios 1 y 2 de FcγRIIa que se une a Fc es un fragmento que comprende los aminoácidos 90 a 174 de la secuencia de aminoácidos FcγRIIa, que incluye los restos del enlazador del ectodominio 1 y ectodominio 2 y los bucles BC (W113-V119), C'E (P132-P137) y FG (G159-Y160) de ectodominio 2. Los estudios de cristalografía de rayos X han revelado que dentro de este fragmento, los aminoácidos 113-116, 129, 131, 133, 134, 155, 156 y 158-160 hacen importantes contribuciones a la superficie del fragmento que es capaz de unirse al dominio Fc de la IgG (memoria de patente internacional n° WO 2005/075512).

5 La proteína o polipéptido también puede ser un heteropolímero de una región de unión a Fc procedente de un receptor de tipo FcγRII y una región de unión a Fc de otra fuente (por ejemplo, una región de unión a Fc de otro tipo de receptor de Fc tal como otro tipo FcγR o una región que se une a Fc de otros receptores de inmunoglobulina tales como receptores para IgA e IgE). Una molécula especialmente preferida de este tipo es un heterodímero de una región de unión a Fc procedente de un receptor tipo FcγRII (en particular, FcγRIIa) y una región de unión a Fc procedente de un receptor de tipo FcγRIII.

10 Considerando que las regiones de unión a Fc "procedentes de" un determinado receptor Fc incluyen regiones de unión que tienen una secuencia de aminoácidos, lo que equivale a la de un receptor Fc, así como las regiones de unión a Fc que contienen una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la región de unión a Fc que se encuentra en un receptor Fc. Dichas modificaciones de aminoácidos pueden incluir sustituciones, eliminaciones, adiciones de aminoácido(s) o una combinación de cualquiera de esas modificaciones, y pueden alterar la actividad biológica de la región de unión a Fc con respecto a la de un receptor Fc (por ejemplo, las modificaciones de aminoácidos pueden mejorar la selectividad o afinidad por inmunocomplejos, tales modificaciones en los aminoácidos 133, 134, 158-161 se describen en la memoria de la patente internacional nº WO 96/08512). Por otra parte, las regiones de unión a Fc procedente de un determinado receptor Fc pueden incluir una o más modificaciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad biológica de la región de unión a Fc respecto a la de un receptor Fc. Las modificaciones de aminoácidos de este tipo normalmente comprenden sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos ejemplificativas se proporcionan en la Tabla 1 a continuación. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos previstas son las siguientes: G, A, V, I, L, M; D, E, N, Q; S, C, T; K, R, H; y P, α -alquilaminoácidos. En general, los sustituciones conservadoras de aminoácidos se seleccionarán basándose en que no tienen ningún efecto sustancial sobre (a) la estructura del esqueleto del polipéptido de la región de unión a Fc en el lugar de la sustitución, (b) la carga o hidrofobia del polipéptido en el lugar de la sustitución y/o (c) la mayor parte de la cadena lateral de aminoácido en el lugar de la sustitución. Cuando se prepara por síntesis una región de unión a Fc incluyendo uno o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, la región de unión a Fc puede incluir también un aminoácido o aminoácidos no codificados por el código genético, como el ácido γ -carboxiglutámico e hidroxiprolina y D-aminoácidos.

Tabla 1 Sustituciones conservadoras de aminoácidos ejemplificativas

	Sustituciones conservadoras
Ala	Val*, Leu, Ile
Arg	Lys*, Gln, Asn
Asn	Gln*, His, Lys, Arg, Asp
Asp	Glu*, Asn
Cys	Ser
Gln	Asn*, His, Lys
Glu	Asp*, ácido γ -carboxiglutámico (Gla)
Gly	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg*

Tabla 1 (continuación)

	Sustituciones conservadoras
Ile	Leu*, Val, Met, Ala, Phe, norleucina (Nle)
Leu	Nle, Ile*, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg*, Gln, Asn, ornitina (Orn)
Met	Leu*, Ile, Phe, Nle
Phe	Leu*, Val, Ile, Ala
Pro	Gly*, hidroxiprolina (Hyp), Ser, Thr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe*, Thr, Ser
Val	Ile, Leu*, Met, Phe, Ala, Nle

* indica sustituciones conservadoras preferidas.

5 Las regiones de unión a Fc están unidas por un enlace peptídico o por una secuencia enlazadora corta (por ejemplo, un solo aminoácido o un péptido corto, por ejemplo, de 2 a 20 aminoácidos de longitud).

10 Preferentemente, la proteína o polipéptido de la presente invención comprende un polipéptido en el que las regiones de unión a Fc están unidas en una configuración "cabeza con cola". Es decir, la ("cola") en el terminal C de una primera región de unión a Fc estará unida a la ("cabeza") en el terminal N de una segunda región de unión a Fc. Existirán dos regiones de unión a Fc unidas en una configuración cabeza con cola. Las regiones de unión a Fc estarán unidas mediante un enlace peptídico o mediante una secuencia enlazadora corta (por ejemplo, un solo aminoácido o un péptido corto, por ejemplo, de 2 a 20 aminoácidos de longitud, o, más preferentemente, de 2 a 15 aminoácidos de longitud, de 2 a 10 aminoácidos de longitud, de 2 a 8 aminoácidos de longitud, o aún más preferentemente, de 2 a 5 aminoácidos de longitud). Las secuencias cortas de enlazador adecuadas pueden ser unas secuencias cortas al azar o pueden comprender fragmentos cortos de la región de unión a Fc de FcγR (por ejemplo, fragmentos cortos de 20 o menos aminoácidos procedentes de la región proximal del pedúnculo de la membrana de FcγR. La secuencia enlazadora puede ser una secuencia enlazadora sintética tal como, por ejemplo, GGGGSGGGGS (SEC. ID. n° 4) que presenta poca sensibilidad a la proteólisis. Dicha secuencia enlazadora puede suministrarse en forma de 2 a 5 unidades "Gly4Ser" en tándem. El enlace de las regiones de unión a Fc mediante un enlace peptídico o una secuencia enlazadora corta permite la producción del polipéptido utilizando sistemas de expresión recombinante.

20 En una forma de realización particularmente preferida de un polipéptido según la invención, el polipéptido comprende dos regiones de unión a Fc de FcγRIIa unido en una configuración cabeza con cola.

25 En una forma de realización más particularmente preferida de un polipéptido según la invención, el polipéptido comprende dos regiones extracelulares FcγRIIa que comprende cada una ectodominios 1 y 2, en las que dichas regiones extracelulares están unidas en una configuración cabeza con cola mediante un enlazador que comprende 1 a 20 aminoácidos.

30 El polipéptido de la presente invención puede comprender además una proteína portadora o un polipéptido (es decir, de modo que el polipéptido es "una fusión" de la proteína portadora y del polipéptido y dichas dos o más regiones de unión a Fc enlazadas). La proteína portadora puede ser cualquier proteína portadora o polipéptido muy conocida por los expertos en la materia, pero preferentemente, es albúmina de suero humano (ASH) u otra proteína portadora utilizada frecuentemente para mejorar la biodisponibilidad (es decir, aumentando la vida media del suero del polipéptido cuando se administra a un paciente). Convenientemente, la proteína portadora puede fusionarse al polipéptido expresando el polipéptido como proteína de fusión con dicha proteína portadora según cualquiera de los procedimientos muy conocidos por los expertos en la materia.

35 El polipéptido de la presente invención puede comprender además otras moléculas unidas útiles, por ejemplo, etilenglicol (es decir, para producir un polipéptido PEGilado) para mejorar la biodisponibilidad, moléculas reguladoras del complemento tales como CD46, CD55 y CD59, citocinas (por ejemplo, para permitir la administración de citocinas a los

puntos de inflamación) y receptores de citocina.

Además, como se mencionó anteriormente, dominios de polipéptidos fusionados que pueden unirse entre sí, pueden utilizarse para producir una proteína o polipéptido según la invención.

5 Por tanto, utilizando, por ejemplo, un polipéptido que comprende dos regiones de unión a Fc fusionadas a un dominio polipeptídico que puede unirse a otro dominio polipeptídico, que pueden ser iguales o diferentes y que se fusionan a otro polipéptido que comprende dos regiones de unión a Fc, puede producirse una proteína que comprende cuatro regiones de unión a Fc (en otras palabras, una proteína dimerica que comprende cuatro regiones enlazadas que se unen a Fc). Convenientemente, esto puede conseguirse mediante la utilización de un dominio Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, una IgG tal como IgG₁), ya que dicho dominio Fc puede dimerizarse (es decir con otro dominio Fc). Preferentemente, el dominio Fc se modifica (por ejemplo, por sustitución o sustituciones de aminoácidos en restos críticos para unirse con receptores Fc) para impedir la "autounión" del dominio Fc a las regiones enlazadas que se unen a Fc, así como para impedir la unión a receptores Fc *in vivo*. En un dominio de Fc modificado especialmente preferido para su utilización de esta manera, el dominio Fc procede de IgG₁ (Wines *et al.*, 2000) y comprende la modificación de aminoácido en el aminoácido 234 y/o 235, a saber Leu²³⁴ y/o Leu²³⁵. Estos restos de leucina están dentro de la región bisagra inferior de IgG₁, en la que el receptor de Fc enlaza con el dominio Fc. Uno o ambos restos de leucina pueden sustituirse o eliminarse para impedir el enlace del receptor de Fc (es decir la unión); por ejemplo, uno o ambos Leu²³⁴ y Leu²³⁵ puede(n) sustituirse con alanina (es decir L234A y/o L235A) u otro(s) aminoácido(s) adecuado(s) (Wines *et al.*, 2000).

20 Del mismo modo, utilizando un polipéptido que comprende dos o más regiones de unión a Fc unidas, por ejemplo, en una configuración cabeza con cola mediante un enlace peptídico, la secuencia enlazadora corta u otra reticulación química, que se fusiona a un dominio polipeptídico capaz de unirse a otro dominio polipeptídico, que puede ser igual o diferente y que se fusiona a otro polipéptido que comprende dos o más regiones de unión a FC unidas, puede producirse una proteína que comprende por lo menos cuatro regiones de unión a Fc (en otras palabras, una proteína polimérica que comprende cuatro regiones unidas que se unen a Fc).

25 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una molécula de polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína o polipéptido polimérica/o soluble según el primer aspecto.

30 La molécula de polinucleótido puede estar constituida por un casete de expresión o un vector de expresión (por ejemplo, un plásmido para la introducción en una célula hospedadora bacteriana, o en un vector vírico tal como un vector de baculovirus para la transfección de una célula hospedadora de insecto, o un plásmido o vector vírico tal como un lentivirus para la transfección de una célula hospedadora de mamífero).

Por tanto, en un tercer aspecto, la presente invención, proporciona una célula hospedadora recombinante que contiene una molécula de polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína o polipéptido polimérica/o soluble según el primer aspecto.

35 La célula hospedadora recombinante puede seleccionarse de entre células bacterianas tales como *E. coli*, células de levadura tales como *P. pastoris*, células de insectos tales como células Sf9 de *Spodoptera*, células de mamífero tales como de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de mono (COS) y células 293 de riñón embrionario humano (HEK 293) y células vegetales.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una proteína o polipéptido, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- 40 (i) proporcionar una célula hospedadora recombinante que contiene una molécula de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o polipéptido polimérica/o soluble según el primer aspecto,
- (ii) cultivar dicha célula hospedadora en un medio de cultivo adecuado y en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína o polipéptido polimérica/o soluble, y
- 45 (iii) aislar dicha proteína o polipéptido polimérica/o soluble del medio de cultivo.

La proteína o polipéptido puede aislarse utilizando cualquiera de los procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la proteína o polipéptido puede aislarse fácilmente utilizando técnicas de cromatografía por afinidad de metales o utilizando técnicas de cromatografía con IgG inmovilizada o IgG agregada térmicamente (HAGG).

50 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un paciente para una enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho paciente una proteína o polipéptido polimérica/o soluble según el primer aspecto opcionalmente en combinación con un vehículo o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

El procedimiento es adecuado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como las enfermedades

inflamatorias mediadas por IC incluyendo AR, ITP, SLE, glomerulonefritis y el síndrome de trombosis trombocitopénica inducida por heparina (STTIH).

El paciente normalmente será un ser humano, pero el procedimiento del quinto aspecto puede ser adecuado también para su utilización con otros pacientes animales tales como ganadería (es decir, caballos de carreras) y animales de compañía.

La expresión "vehículo o excipiente aceptable desde un punto de vista farmacéutico o veterinario" hace referencia a cualquier disolvente, agente de suspensión o vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico o veterinario para administrar la proteína o polipéptido de la presente invención al paciente.

La proteína o polipéptido puede administrarse al paciente por cualquiera de las vías bien conocidas por los expertos en la materia, en particular por administración intravenosa (iv), administración intradérmica (id) y administración subcutánea (sc) y administración oral y nasal. Para la administración subcutánea, la administración puede conseguirse por inyección o mediante un catéter insertado bajo la piel. Alternativamente, la administración subcutánea puede conseguirse mediante composiciones de implante de liberación lenta o composiciones inyectables de liberación retardada.

Por lo general, la proteína o polipéptido se administrará a una dosis comprendida en el intervalo entre 0,5 y 15 mg/kg de peso corporal del paciente al día. Los expertos en la materia, sin embargo, apreciarán que la cantidad de una "dosis eficaz" (es decir, una cantidad de dosis que sea efectiva en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria) variará según numerosos factores incluyendo la edad y la salud general del paciente y la gravedad de la enfermedad inflamatoria que ha de tratarse. Los expertos en la materia podrán identificar u optimizar una cantidad de dosis eficaz apropiada para cada paciente en concreto.

En otros aspectos de la presente invención, se proporciona una composición que comprende una proteína o polipéptido polimérica/o soluble según el primer aspecto opcionalmente en combinación con un vehículo o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, y la utilización de una proteína o polipéptido polimérica/o soluble en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

Además, la proteína o polipéptido del primer aspecto es útil también en otras aplicaciones aparte del tratamiento de un paciente durante una enfermedad inflamatoria. Es decir, la proteína o polipéptido puede utilizarse en análisis de diagnóstico para detectar complejos inmunitarios circulantes (CI) asociados a la patología de enfermedades autoinmunitarias tales como AR y SLE, en las que la proteína o polipéptido pueden utilizarse en una etapa de "captura" de CI (por ejemplo, uniendo la proteína o polipéptido a un sustrato adecuado tal como una placa de ELISA) en lugar de la etapa de precipitación típica (con polietilenglicol) empleada en dicho análisis. Después de capturar CI de una mezcla (por ejemplo, una mezcla de suero o de líquido sinovial de un paciente) para ser analizada, el CI capturado puede detectarse utilizando la proteína o polipéptido en una forma mediante la cual está unida a una molécula que puede servir como marcador o indicador (por ejemplo, moléculas radiomarcadas, moléculas quimioluminiscentes, moléculas bioluminiscentes, moléculas fluorescentes o enzimas tales como peroxidasa de rábano picante que pueden generar señales detectables). Alternativamente, el CI capturado puede detectarse o "sondarse" utilizando anticuerpos específicos para determinados autoantígenos (por ejemplo, citrulina en AR, ADN en LED, La/SS-B en el síndrome de Sjögren y ADN topoisomerasa I en esclerodermia) para permitir la determinación del nivel de autoantígenos específicos en el CI circulante, que puede permitir el desarrollo de análisis para las enfermedades autoinmunitarias con resultados mejorados de diagnóstico o pronóstico. Además, de manera similar, el CI capturado por la proteína o el polipéptido de la presente invención unido a un sustrato adecuado, podría detectarse o "sondarse" utilizando anticuerpos específicos para determinados antígenos de patógenos infecciosos (por ejemplo, bacterias tales como *Staphylococcus* y *Streptococcus*, parásitos como *P. falciparum* (malaria) y virus tales como el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de Epstein-Barr (VEB), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y arbovirus causante de la fiebre Dengue), para proporcionar información útil en la identificación del patógeno causante de una infección, el pronóstico de la enfermedad y/o el tratamiento y pronóstico de una infección.

Aún más, la proteína o el polipéptido de la presente invención es también útil en varios bioanálisis en los que puede inhibir útilmente la liberación del factor de necrosis tumoral (FNT) de las células incluyendo macrófagos, dendrocitos (DC) y neutrófilos. Además, cuando se une a una molécula que puede servir como marcador o indicador tal como las mencionadas anteriormente, la proteína o polipéptido puede utilizarse en detección por la imagen *in vivo* de los puntos de inflamación.

Todavía más, la proteína o polipéptido de la presente invención es útil para la eliminación del CI circulante asociada a enfermedades inflamatorias mediadas por CI, en las que la proteína o polipéptido está unido a un sustrato adecuado tal como un lecho inerte, fibra u otra superficie y expuesto a un fluido biológico (particularmente sangre) de un paciente que contiene complejos CI de modo que los CI se capturan y posteriormente se retiran del fluido biológico. El fluido biológico tratado, que es sustancialmente reducido en CI, puede devolverse a continuación al paciente del que se extrajo.

Para que la naturaleza de la presente invención pueda apreciarse con mayor detalle, las formas preferidas de las mismas se describirán a continuación haciendo referencia a los ejemplos no limitativos siguientes.

EJEMPLOS**EJEMPLO 1 Producción, purificación y caracterización de polipéptidos del polímero FcR****Materiales y procedimientos***Construcción de vectores de expresión poliméricos FcγRIIIa*

5 La región de unión a Fc que comprende los ectodominios 1 y 2 de FcγRIIIa humanos se ampliaron utilizando la polimerasa termoestable *Pwo* (Roche), el clon Hu 3.0 (Hibbs *et al.*, 1988, nº de registro 021642) como plantilla de ADNc y los cebadores oBW10 GTAGCTCCCCAAAGGCTG (SEC. ID. nº 1) y oBW11 CTACCCGGGTGAAGAGCTGCCATG (SEC. ID. nº 2). La mitad de *Sna*BI (todas las enzimas modificadoras del ADN eran de New England Biolabs) y las secuencias *Sma*I se subrayan. El producto truncado de RPC se ligó utilizando T4 ADN ligasa en el vector pPIC9 (Invitrogen, Life Technologies) y la secuencia *Eco*RI completada con un fragmento *Klenow* de ADN polimerasa I que proporciona el vector pBAR14. Para producir el vector pBAR28 que codifica los ectodominios en tándem de FcγRIIIa, pBAR14 se digirió con *Sna*BI en la que la secuencia del fragmento *Sna*BI/*Sma*I de pBAR14 se ligó.

15 Se construyó un vector de baculovirus para expresar ectodominios polimerizados de FcγRIIIa de la manera siguiente: El fragmento que codifica la secuencia principal de FcγRIIIa y los ectodominios 1 y 2 se obtuvieron del pVL-1392 (Powell *et al.*, 1999 y Maxwell *et al.*, 1999) por digestión con *Eco*RI y *Xba*I y a continuación se ligaron en las secuencias *Eco*RI/*Xba*I de pBACPAK9 (Invitrogen Life Tech) en el que la secuencia *Bam*HI en el punto de clonación múltiple se había eliminado en primer lugar digiriendo con *Bam*HI por relleno utilizando fragmento *Klenow* de ADN polimerasa y religadura. Este montaje, el vector pBAR69, se digirió con *Bam*HI a la que se ligó el fragmento *Bam*HI de pBAR28 que proporciona los vectores pBAR71, pBAR72 y pBAR73 que codifica el dímero, trímero y tetrámero de FcγRIIIars, respectivamente. Las dimensiones de la inserción fueron definidas por el digesto *Eco*RI/*Xba*I y la correcta orientación del fragmento *Bam*HI de polimerización se identificó mediante el digesto *Pvu*II utilizando protocolos habituales.

25 Los vectores de expresión del mamífero que codifican el monómero y el dímero de FcγRIIIa se produjeron de la manera siguiente: El clon Hu3.0 del ADNc con FcγRIIIa (Hibbs *et al.*, 1988, y DEFINITION: Fragmento Fc para *Homo sapiens* de IgG, Ila de baja afinidad, receptor (CD32) (FCGR2A), ARNm, nº de registro 021642) se amplió utilizando *accuprime Pfx* RCP (Invitrogen, Life Technologies) y se clonó en el vector Gateway™ pDONR™221 (Invitrogen, Life Technologies) utilizando la reacción con BP clonasa™ según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Life Tech.) proporcionando el pNB6. RCP utilizando polimerasa *accuprime Pfx* de pNB6 con los cebadores oBW11 y oBW302 TCTCATCACCACCATCACCACGCTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAG (SEC. ID. nº 3), digestión con *Sma*I y ligadura con T4 ligasa dio pBAR390 que codifica la FcγRIIIars con etiqueta de hexahistidina en el terminal C. La digestión de pBAR390 con *Bam*HI y ligadura del fragmento *Bam*HI de pBAR28 dio el vector pBAR397, que codifica el dímero de FcγRIIIars. Se utilizó a continuación el digesto *Pvu*II para identificar la orientación del fragmento *Bam*HI dimerizante y el secuenciado con ABI BigDye3.1 (Applied Biosystems) confirmó la secuencia diana. La reacción con LR clonasa de Gateway (Invitrogen, Life Technologies) se utilizó a continuación para transferir el monómero FcγRIIIa (pBAR390) o el dímero (pBAR397) en el vector de expresión pAPEX3P adaptado al marco de lectura Gateway™-casete A (Invitrogen, Life Technologies) (Evans *et al.*, 1995 y Christiansen *et al.*, 1996) para proporcionar los vectores de expresión pBAR426 y pBAR427. Asimismo, se utilizó la reacción con Gateway LR clonasa para transferir el monómero (pBAR390) o el dímero (pBAR397) de FcγRIIIa en el vector de expresión pIRESneo (Clontech) adaptado en el marco de lectura Gateway™-casete A (Invitrogen, Life Technologies). La figura 1 representa la secuencia de polinucleótidos (y la secuencia de aminoácidos traducida) para el montaje del dímero "cabeza con cola" de FcγRIIIa en pBAR397 utilizado para construir el vector de expresión pBAR427. Las dos repeticiones se presentan como aminoácidos 1 a 174 (es decir, la primera región que une a Fc) y 184 a 362 (es decir, la segunda región de unión a Fc) y se conectan mediante un fragmento corto (secuencia de 8 aminoácidos; restos 175 a 182) del pedúnculo proximal de la membrana de FcγRIIIa más un resto de valina adicional (resto 183 subrayado en la figura 1). Los aminoácidos 31 a 1 de la secuencia representada en la figura 1 representan la secuencia natural principal de FcγRIIIa.

Producción de polipéptidos del monómero y del dímero FcγRIIIars

50 La expresión de los polipéptidos *del dímero* de FcγRIIIa (FcγRIIIars) recombinante soluble en células HEK 293E se llevó a cabo por transfección con 5 µg de ADN plásmido (pBAR426, pBAR427) en pocillos de 10 cm² y reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Life Technologies) o reactivo Transit (BioRad Laboratories) según las instrucciones del fabricante. Tras 48 horas, las células transfectadas se seleccionaron a continuación por incubación en 4 µg/ml de puomicina. Las células seleccionadas en puomicina se cultivaron a continuación en medio CD293 enriquecido con FCS al 1% (Invitrogen, Life Technologies) hasta la fase estacionaria. El producto recombinante se purificó posteriormente por cromatografía sobre columnas con níquel (Qiagen) o cobalto (Clontech) inmovilizados y se purificó más utilizando cromatografía por exclusión de tamaño Superdex 200 o Superdex G75 (Amersham/Pharmacia).

Comparación de las mediciones por afinidad de los polipéptidos monomérico y dimérico de FcγRIIIars

Utilizando un protocolo analítico BIAcore normalizado (Wines *et al.*, 2001; Wines *et al.*, 2003), se realizaron

mediciones para el monómero y el dímero de FcγRIIars purificados; el monómero o el dímero de FcγRIIars se inyectó a concentraciones variables sobre monómero de IgG humana inmovilizado (Sandoglobulina, Novartis) o IgG aglomerada térmicamente (HAGG, Wines *et al.*, 1988; Wines *et al.*, 2003) durante 60 minutos, tras los cuales se regeneró la superficie (Wines *et al.*, 2003). La inmovilización del monómero de IgG humana en la superficie del biodetector hace que sea una matriz polivalente que simula un inmunocomplejo.

Comparación de la actividad inhibidora de los polipéptidos del monómero y del dímero FcγRIIars

El monómero y el dímero de FcγRIIars purificado se incubó con cantidades crecientes de una solución de monómero de IgG humano (Sandoglobulina) y dímero de IgG (Wright *et al.*, 1985). Se midió a continuación la cantidad de polipéptido receptor libre inyectando sobre monómero de IgG humano inmovilizado según un protocolo analítico BIAcore normalizado.

Inhibición de la unión del inmunocomplejo a células humanas por polipéptidos del monómero y del dímero FcγRIIars

La unión de pequeños inmunocomplejos (representada por el dímero de IgG a neutrófilos humanos (V1 y V5 de voluntarios) se determinó en ausencia y presencia de polipéptidos monoméricos y diméricos purificados de FcγRIIars mediante análisis de citometría de flujo (Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience).

Inhibición de la secreción por FNT de los MDM estimulados por inmunocomplejo (macrófagos procedentes de monocitos) por polipéptidos del monómero y del dímero FcγRIIars

En un primer experimento, se extrajeron células mononucleares periféricas de sangre humana (voluntario V5) clasificadas como positivas para la expresión de CD14 utilizando un clasificador automacs (Miltenyi Biotec) y se dejaron diferenciar durante 24 horas en presencia de M-CSF hasta MDM (macrófagos procedentes de monocitos) antes de la estimulación con concentraciones variables de pequeños inmunocomplejos (representados por dímero de IgG), en ausencia y presencia del dímero de FcγRIIars (en sobrenadante a razón de 2,5 µg/ml). La secreción de FNT procedente de los MDM se midió a continuación por ELISA con FNT humano según el protocolo del fabricante (BD Pharmingen). En un segundo experimento, se produjeron de igual modo los MDM *ex vivo* procedentes de la sangre humana (esta vez del voluntario V1) y se dejaron diferenciar durante 24 horas antes de la estimulación con concentraciones variables de pequeños inmunocomplejos (es decir dímero de IgG) en ausencia y presencia del dímero de FcγRIIars (en sobrenadante a razón de 2,5 µg/ml).

Inhibición de la activación por el inmunocomplejo de plaquetas por polipéptidos del dímero de FcγRIIars

Se prepararon plaquetas lavadas por centrifugación a baja velocidad de sangre completa (Thai *et al.*, 2003) y se estimularon con IgG aglomerada térmicamente (HAGG). Se midió la activación de las plaquetas aumentando la expresión en superficie de P-selectina (CD62P) por citometría de flujo (Lau *et al.*, 2004).

Resultados

Expresión de polipéptidos del monómero y del polímero de FcγRIIars

El análisis por inmunotransferencia Western del sobrenadante de células infectadas demostró la producción con éxito de formas diméricas y triméricas de FcγRIIa recombinante soluble (figura 2). Aunque se detectó algún polipéptido trimérico este se escindió en gran medida a la forma dimérica y el tetrámero no se detectó escindiéndose en gran medida dando una forma dimérica. Ya que el dímero de FcγRIIa era intrínsecamente el más estable, éste se caracterizó más y se desarrolló en un sistema de expresión de mamífero (es decir, células HEK293E).

Sin embargo, dado que FcγRIIa natural puede despojarse de las superficies celulares de los leucocitos por proteólisis (Astier *et al.*, 1994), una estrategia para minimizar la proteólisis de trímeros, tetrámeros y polímeros mayores sería eliminar o más preferentemente reemplazar la secuencia enlazadora del pedúnculo proximal de la membrana que une las regiones extracelulares de FcγRIIa. Por ejemplo, la sensibilidad proteolítica de la secuencia enlazadora del pedúnculo proximal de la membrana podría reducirse mediante una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, una o más sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos) o sino sustituyendo esta secuencia enlazadora por una secuencia enlazadora sintética tal como, por ejemplo, GGGGSGGGGS (SEC. ID. nº 4) que tiene una baja sensibilidad a la proteólisis.

Otra estrategia para producir con éxito, dímeros, tetrámeros o polímeros mayores, consistiría en enlazar un polipéptido dimérico expresado a uno o más polipéptidos monoméricos o diméricos mediante reticulación química. Los polímeros de dímeros de FcγRIIa pueden producirse también expresando el polipéptido dimérico como proteína de fusión con un dominio Fc (por ejemplo, un dominio Fc de IgG) que es del propio polipéptido dimérico y de este modo dimerizan cualquier acompañante de la fusión.

Expresión de polipéptidos del monómero y del dímero FcγRIIars en células de mamífero

El rendimiento en proteínas para el monómero purificado de FcγRIIars fue de 3 mg/l (montaje pBAR426) y para el dímero de FcγRIIars, hasta ~0,5 mg/l (montaje pBAR427). La figura 3 presenta la SDS-PAGE teñida con Coomassie

(gel de acrilamida al 12%, en condiciones no reductoras) de las fracciones recolectadas de la purificación del monómero y dímero de FcγRIIars. El monómero FcγRIIars tenía el tamaño esperado de ~30 kDa (a), mientras que el dímero de FcγRIIars presentaba el tamaño esperado de ~60 kDa (b).

Comparación de mediciones de afinidad de los polipéptidos del monómero y del dímero FcγRIIars

5 Los resultados del análisis se representan en las figuras 4 y 5. Los análisis indicaron que el monómero FcγRIIars tiene una sola secuencia de unión con disociación con una constante de disociación por afinidad (K_D) de 1,7 μ M para el monómero de IgG humano y 1,05 μ M para HAGG. En el caso del dímero de FcγRIIars, los datos de unión se ajustaron mejor a un modelo de secuencia de dos enlaces con constantes de disociación por afinidad (K_D) de 3,2 nM (K_{D1}) y 100 nM (K_{D2}) para el monómero de IgG humano inmovilizado y 2,73 nM (K_{D1} ; aproximadamente 300 veces menor que la K_D de FcγRIIars monomérico y 99 nM (K_{D2}) para HAGG.

Comparación de la actividad inhibidora de los polipéptidos del monómero y del dímero FcγRIIars

15 Los experimentos realizados para comparar la actividad inhibidora de los polipéptidos del monómero y del dímero FcγRIIars demostraron que, en solución, el monómero FcγRIIars (figura 6a) no distingue entre el monómero de IgG humana y pequeños inmunocomplejos (es decir representados por el dímero de IgG). En cambio, el dímero de FcγRIIars (figura 6b) en solución se une selectivamente a pequeños inmunocomplejos (es decir, dímero de IgG) sobre el monómero de IgG humana.

Inhibición de la unión del inmunocomplejo a células humanas por polipéptidos del monómero y del dímero FcγRIIars

20 Los resultados de los ensayos de inhibición se representan en las figuras 7a y 7b, y éstos indican que el dímero de FcγRIIars ($IC_{50} = 1,1 \mu$ g/ml) es ~10 veces más activo que el monómero FcγRIIars ($IC_{50} = 10,5 \mu$ g/ml) en pequeños complejos inmunitarios inhibidores (es decir, dímero de IgG) procedente de la unión a neutrófilos humanos. Además, los resultados demostraron que la inhibición de pequeños inmunocomplejos (dímero de IgG) procedentes de la unión a neutrófilos humanos por el dímero de FcγRIIars era reproducible con neutrófilos procedentes de dos individuos diferentes, con una IC_{50} entre 0,9 y 1,1 μ g/ml.

25 *Inhibición de la secreción de FNT procedente de los MDM estimulados por inmunocomplejo (macrófagos procedentes de monocitos) por los polipéptidos del monómero y del dímero FcγRIIars*

Los resultados se representan en las figuras 8a y 8b. El dímero de FcγRIIars parecía inhibir la secreción de FNT estimulada por el inmunocomplejo (es decir, dímero de IgG) procedente de los MDM humanos diferenciados 24 horas.

Inhibición de la activación del inmunocomplejo de plaquetas por polipéptidos del dímero de FcγRIIars

30 Se incubaron plaquetas humanas lavadas con HAGG (10 μ g/ml) en presencia y ausencia de dímero de FcγRIIars a razón de 30 μ g/ml durante 30 minutos. Como se representa en la figura 9, se observó que la activación de plaquetas se inhibía en presencia del dímero de FcγRIIars como se prueba por la menor expresión de P-selectina (CD62P).

Exposición

35 FcγRIIa recombinante soluble en forma monomérica (monómero FcγRIIars) y dimérica (dímero de FcγRIIars) se expresó con éxito en células HEK 293E. Los análisis de unión en equilibrio BIAcore demostraron que el dímero de FcγRIIars tiene un avidez mayor de ~300 veces por IgG inmovilizada (Sandoglobulina) que el receptor monomérico (es decir, el monómero FcγRIIars tiene una K_d ~1 μ M en tanto que el dímero de FcγRIIars tiene una K_D ~3 nM en la interacción con la IgG inmovilizada). Los experimentos de competencia utilizando BIAcore demostraron también que el dímero de FcγRIIars se une selectivamente a pequeños inmunocomplejos, y se confirmó la actividad inhibidora selectiva en ensayos a base de células utilizando neutrófilos precedentes de dos donantes. Se demostró también que el dímero de FcγRIIars es aproximadamente 10 veces más potente que un inhibidor de la unión del pequeño inmunocomplejo de IgG que el monómero FcγRIIars, y en ensayo habitual de plaquetas, se observó que el dímero de FcγRIIars inhibe completamente la activación del inmunocomplejo de plaquetas (es decir, el dímero de FcγRIIars es un potente inhibidor de la activación celular). Se considera por consiguiente que el dímero de FcγRIIars y otras proteínas poliméricas solubles y polipéptidos según la invención son muy prometedores para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria mediada por CI tales como AR y LED.

EJEMPLO 2 Producción, purificación y características del polipéptido dimérico FcγRIIars

Materiales y procedimientos

50 *Producción de polipéptidos del dímero FcγRIIars*

El montaje dimérico de FcγRIIa descrito en el Ejemplo 1 se clonó en un vector de expresión de mamífero bajo el control de un activador de CMV modificado. Se crearon a continuación CHO-S transfectantes estables de la forma

siguiente: se recolectaron las células CHO-S a 90% de confluencia, se lavaron tres veces y se dispersaron 2×10^7 células en 15 ml de medio en placas petri de 10 cm. Los complejos de ADN-lipofectamina 2000 linealizados (proporción 1:2,5) se incubaron a continuación durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron gota a gota a las células. Posteriormente, se incubaron las células a 37°C durante 48 horas, y a continuación se colocaron en placas en dilución restrictiva en placas de 96 pocillos en medio CD-CHO enriquecido con 600 µg/ml de higromicina B, L-glutamina 8 mM, 1 x HT enriquecido y 50 µg/ml de sulfato de dextrano. Se identificaron las células por ELISA convencional para detectar la proteína FcγRIIa soluble, y las líneas de expresión mayores se subclonaron otra vez por dilución restrictiva. Un clon (nº 6) segregó el dímero de FcγRIIa a aproximadamente 40 mg/l y se cultivó en matraces agitadores a 30°C para la expresión proteica óptima.

Se concentró el sobrenadante que contenía el dímero de FcγRIIars por filtración en flujo tangencial y se intercambió en tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,4. La muestra se diluyó a continuación cuatro veces en fosfato sódico 20 mM y cloruro sódico 0,5 M y se purificó sobre una columna HisTrap FF de 2 x 5 ml (GE Healthcare), eluyendo en fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 0,5 M pH 7,4 e imidazol 100 mM. El material eluido se dializó y purificó por cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna Q FF de 25 ml (GE Healthcare) y eluyendo en cloruro sódico 150 mM. El material purificado se dializó a continuación en solución salina tamponada con fosfato.

Bloqueo de la unión de HAGG a FcγRIIb con polipéptidos diméricos FcγRIIars

Se evaluó la capacidad del dímero de FcγRIIars purificado para bloquear el complejo inmunitario que se une a FcγRIIb de la superficie celular por un ensayo citométrico de flujo. Se incubó IgG aglomerada térmicamente (HAGG) con varias concentraciones de dímero de FcγRIIars o monómero FcγRIIars (R&D Systems, nº de Cat. 1330-CD/CF) durante 1 hora a 4°C. Estas mezclas se añadieron a continuación a placas de 96 pocillos que contenían 10^5 células IIA1.6 transfectadas con FcγRIIb (IIA1.6 es una estirpe de linfoma B de ratones que carece de expresión endógena de FcγR). Se incubaron las placas durante 1 hora a 4°C, se lavaron y se tiñeron a continuación con un conjugado anti-hIgG-FITC para detectar HAGG unida. Después de lavado, se analizaron las células en un citómetro de flujo FACS Scan utilizando protocolos convencionales.

Bloqueo de la activación de plaquetas provocada por HAGG con polipéptidos del dímero FcγRIIars

La exposición de las plaquetas produce la activación de HAGG mediante FcγRIIa, lo que conduce al incremento de P-selectina (CD62P). La capacidad del dímero de FcγRIIars o del monómero FcγRIIars para bloquear esta activación se evaluó mediante un ensayo citométrico de flujo. Se incubó IgG aglomerada térmicamente (HAGG) con varias concentraciones de dímero de FcγRIIars o del monómero FcγRIIars (R&D Systems, nº de Cat. 1330-CD/CF) durante 1 hora a 4°C. La mezcla se añadió a continuación a placas de 96 pocillos que contenían 3×10^7 plaquetas humanas, que se habían lavado previamente y se volvieron a poner en suspensión en tampón Tyrodes/Hepes enriquecido con EDTA 1 mM. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las células, se fijaron y se tiñeron para la expresión de CD62P y GPIIb (CD41) por procedimientos normalizados y se analizó en un citómetro de flujo FACS Scan.

Los polipéptidos del dímero FcγRIIars bloquean la activación de MC/9 producida por el inmunocomplejo

La MC/9 es una estirpe de mastocitos murinos positivos a FcγR se activa y libera FNT-α tras la exposición a inmunocomplejos. Se evaluó la capacidad del dímero de FcγRIIars o del monómero FcγRIIars para bloquear esta activación utilizando complejos inmunitarios constituidos por ovoalbúmina y anticuerpo antiovoalbúmina (OVA IC) como estímulo. Se incubaron OVA IC (10 µg) con varias concentraciones de dímero de FcγRIIars o monómero FcγRIIars (R&D Systems, nº de Cat. 1330-CD/CF) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió a continuación la mezcla a placas de 96 pocillos que contenían 2×10^5 células MC/9 y se incubó durante la noche a 37°C. Se recolectó el sobrenadante y se midió la cantidad de FNT-α utilizando un kit ELISA comercial (BD Biosciences).

Resultados

Producción de polipéptidos del dímero de FcγRIIars

La figura 10 representa los análisis de material de FcγRIIars purificado, incluyendo SDS-PAGE (en condiciones reductoras y no reductoras); inmunotransferencia Western utilizando un anticuerpo anti-FcγRIIa (R&D Systems, número de catalogo AF1875) y peroxidasa anti-IgG de cabra en conejo como detector de anticuerpos; y HPLC. El polipéptido migra como una sola banda al peso molecular esperado (~50 kD), reacciona con el anticuerpo anti-FcγRIIa y presenta más de 96% de pureza determinada por análisis HPLC.

Los polipéptidos del dímero de FcγRIIars bloquean la unión de HAGG a rsFcγRIIb

Los resultados del ensayo de unión de HAGG se representan en la figura 11. Tanto el dímero de FcγRIIars como el monómero FcγRIIars son capaces de bloquear completamente la unión de HAGG a FcγRIIb de la superficie celular. Sin embargo, el dímero de FcγRIIars (IC50 = 3,9 ng/ml) fue más de 500 veces más potente que la proteína monomérica (IC50 = 2.082 ng/ml).

Los polipéptidos del dímero de FcγRIIars bloquean la activación de plaquetas inducida por HAGG

La figura 12 representa los resultados del ensayo de activación de plaquetas. El porcentaje de plaquetas activadas (positivo tanto para CD41 como para CD62P) después del tratamiento con HAGG solo se definió en 100%. Tanto el dímero de FcγRIIars como el monómero FcγRIIars podían reducir de manera significativa el incremento de CD62P inducida por HAGG. La valoración puso de manifiesto que el dímero de FcγRIIars (IC50 = 3,9 µg/ml) fue 5 veces más potente que el monómero FcγRIIars (IC50 = 20,9 µg/ml).

Los polipéptidos del dímero FcγRIIars bloquean la activación de MC/9 inducida por el inmunocomplejo

Los resultados del ensayo de activación de MC/9 se muestran en la figura 13. La cantidad de FNT-α liberada después de la incubación con los OVA IC solos se definió en 100%. Tanto el dímero de FcγRIIars como el monómero FcγRIIars pudieron suprimir completamente la liberación de FNT-α inducida por inmunocomplejos. La valoración puso de manifiesto que el dímero de FcγRIIars (IC50 = 2,1 µg/ml) fue 8 veces más potente que el monómero FcγRIIars (IC = 17,7 µg/ml).

Exposición

El dímero de FcγRIIars se expresó con éxito en células CHO-S. Se demostró por SDS-PAGE reductora y no reductora que el dímero de FcγRIIars purificado presentaba un tamaño de aproximadamente 50 kDa, y por inmunotransferencia Western se demostró que el dímero estaba específicamente unido por anticuerpos anti-FcγRIIa. Se determinó por HPLC que el dímero de FcγRIIars tenía una pureza del 96%.

Tanto el dímero de FcγRIIars como el monómero FcγRIIars bloquearon completamente la unión de HAGG a FcγRIIb de la superficie celular, presentando el dímero de FcγRIIars un aumento de la eficacia de bloqueo de aproximadamente 500 veces más que el monómero FcγRIIars. Del mismo modo tanto el dímero de FcγRIIars como el monómero FcγRIIars redujeron significativamente la activación de plaquetas inducida por HAGG, mostrando el dímero aproximadamente 5 veces mayor eficacia que el monómero FcγRIIars. Además, tanto el dímero de FcγRIIars como el monómero FcγRIIars suprimieron la activación de la estirpe de mastocitos de ratón (MC/9), medida por la liberación de FNT-α, presentando el dímero una eficacia 8 veces mayor que la del monómero.

EJEMPLO 3 Ingeniería y expresión de polipéptidos de fusión FcγRIIars

Materiales y métodos

Construcción de vectores de expresión de la fusión FcγRIIars

Los polinucleótidos que codifican el monómero soluble de FcγRIIa o el dímero soluble de FcγRIIa se fusionaron independientemente a un polinucleótido que codifica IgG₁-FcγR1 (L234A, L235A).

El terminal C del polipéptido del monómero soluble de FcγRIIa se fusionó funcionalmente a un polipéptido IgG₁ humano en una posición en la parte del terminal N del enlace disulfuro entre la cadena en la bisagra inferior que une con enlace covalente las dos partes de Fc. La fusión en esta posición genera una proteína de fusión monomérica FcγRIIa-IgG₁-FcγR1 (L234A, L235A) que se dimerizará con un segundo dominio Fc debido a las interacciones presentes entre los dominios Fc asociados por enlace covalente. La región bisagra de IgG es conocida por su flexibilidad, y la fusión del polipéptido que comprende la región bisagra Fc a la parte terminal N del enlace disulfuro entre la cadena en la bisagra inferior permite una considerable libertad de movimiento de la región de unión a Fc.

De igual modo, el terminal C del polipéptido soluble del dímero FcγRIIa se fusionó funcionalmente al polipéptido IgG₁ humano en una posición de la parte del terminal N del enlace disulfuro entre la cadena en la bisagra inferior que une con enlace covalente las dos fracciones Fc.

Los polinucleótidos que codifican el monómero soluble de FcγRIIa o el dímero soluble de FcγRIIa se fusionaron independientemente a un polinucleótido que codifica la albúmina de suero humano (ASH) de manera equivalente a la descrita anteriormente en la memoria de patente internacional n° WO 96/08512. Como se da a conocer en la presente memoria, la ASH se fusionó al terminal N del monómero FcγRIIars. De manera similar, la ASH se fusionó al terminal N del dímero de FcγRIIars.

Los polinucleótidos que codifican varios polipéptidos o proteínas de fusión se insertaron funcionalmente en pAPEX 3P-xDEST utilizando técnicas de clonación convencionales.

Producción de monómero FcγRIIars y fusiones del dímero de FcγRIIars

El monómero FcγRIIars y los vectores de expresión de la fusión del dímero se transfectaron temporalmente en células CHOP y se transfectaron establemente en células 293E utilizando métodos normalizados. Los sobrenadantes de las células CHOP transfectados temporalmente se inmunoprecipitaron utilizando anticuerpo 8.2 anti-FcγRIIa (Powel *et al.*, 1999) y los inmunoprecipitados se sometieron a SDS-PAGE (12%) no reductora. Se realizaron a continuación análisis de inmunotransferencia Western utilizando métodos normalizados y utilizando anticuerpo anti-FcγRIIa de conejo (Maxwell *et al.*, 1999) como anticuerpo primario e Ig-HRP anticonejo como anticuerpo secundario.

ELISA de captura de HAGG para la detección de las fusiones de FcγRIIars en sobrenadantes de células CHOP transfectadas

Se realizaron los ELISA de captura de HAGG para medir la actividad de unión a Fc de las fusiones de FcγRIIars. Para examinar la actividad de unión de las fusiones del monómero FcγRIIars, un monómero convencional FcγRIIa conocido (Powel *et al.*, 1999) (a partir de 0,75 µg) y la proteína procedente de una célula transfectada con el monómero FcγRIIars (transfección 426) valorado y comparado con la unión de la proteína procedente de las células transfectadas con el monómero FcγRIIars se fusiona a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) (monómero-Fc) y la proteína de las células transfectadas con el monómero FcγRIIars se fusiona a ASH (ASH-monómero).

Para examinar la actividad de unión de las fusiones del dímero de FcγRIIars, un conocido dímero convencional de FcγRIIa (a partir de 0,5 µg/ml) y la proteína procedente de una célula transfectada con el dímero de FcγRIIars (transfección 427) se valoraron y compararon con la unión de la proteína de las células transfectadas con el dímero rsFcγ se fusiona a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) (dímero-Fc) y la proteína de las células transfectadas con el dímero de FcγRIIars se fusiona a ASH (ASH-dímero).

ELISA de captura por etiqueta para la detección de las fusiones de FcγRIIars en los sobrenadantes de células CHOP transfectadas

Utilizando el método ELISA convencional, se recubrieron las placas con anticuerpo 8.2 anti-FcγRIIa. Las fusiones de FcγRIIars se añadieron a los pocillos y se pusieron en contacto con el anticuerpo 8.2. El anticuerpo secundario era el anticuerpo 8.7-HRP anti-FcγRIIa (Powel *et al.*, 1999; Ierino *et al.*, 1993a), que es específico para un epítipo de FcγRIIa diferente del anticuerpo 8.2.

Las muestras de FcγRIIars monomérico ensayadas incluían un monómero FcγRIIars conocido (monómero convencional partiendo de 0,75 µg/ml), el sobrenadante de las células transfectadas con monómero FcγRIIars (transfección 426), el sobrenadante de las células transfectadas con el monómero FcγRIIars se fusionan a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) (monómero-Fc) y el sobrenadante de las células transfectadas con el monómero FcγRIIars se fusiona a ASH (ASH-monómero).

Las muestras de FcγRIIars dimérico ensayadas incluían un dímero FcγRIIa conocido (dímero convencional partiendo de 0,5 µg/ml), el sobrenadante de las células transfectadas con el dímero de FcγRIIars (transfección 427), el sobrenadante de las células transfectadas con el dímero de FcγRIIars se fusionan a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) (monómero-Fc) y el sobrenadante de las células transfectadas con el dímero de FcγRIIars se fusiona a ASH (ASH-monómero).

Resultados*Expresión de las fusiones del monómero y dímero de FcγRIIars*

Basándose en la actividad del monómero FcγRIIars purificado y del dímero de FcγRIIars, la fusión de monómero FcγRIIars-IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) se segregó a concentraciones mayores (aproximadamente 12 µg/ml en células 293E) que las de fusión del dímero de FcγRIIars IgG-Fcγ1 (aproximadamente 4 µg/ml en células 293E).

Como se aprecia en la figura 14, los análisis de inmunotransferencia Western indicaban que las proteínas de fusión estaban presentes en el sobrenadante a los tamaños de pesos moleculares esperados y que podían producirse con éxito como distintas proteínas sin pruebas de productos de degradación.

ELISA de captura de HAGG para la detección de las fusiones de FcγRIIars en los sobrenadantes de células CHOP transfectadas

Como se aprecia en la figura 15(a), la fusión del monómero FcγRIIars a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) (monómero-Fc) se unió de forma detectable en el ensayo, mientras que la fusión del monómero FcγRIIars a ASH (ASH-monómero) se observó que se unía escasamente. Este resultado puede explicarse por el hecho de que la fusión del monómero FcγRIIars a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) sea un dímero (de la región de unión a Fc) como consecuencia de la dimerización entre las cadenas pesadas de los dominios Fc fusionados mientras que la fusión del monómero FcγRIIars a ASH permanece monomérica para la región de unión a Fc.

Como se muestra en la figura 15(b), la fusión del dímero de FcγRIIars purificado a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) (dímero-Fc) presentaba actividad de unión similar a la del dímero convencional, y la fusión del dímero FcγRIIars a ASH (ASH-monómero) presentaba actividad de unión detectable, pero menor. En este caso, la fusión del dímero FcγRIIars a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) era, debido a la dimerización entre las cadenas pesadas de los dominios Fc fusionados, tetramérica (o "tetraivalente") para la región de unión a Fc, mientras que la fusión del dímero FcγRIIars a ASH permanece dimérica para la región de unión a Fc.

ELISA de captura por etiqueta para la detección de las fusiones de FcγRIIars en sobrenadantes de células CHOP transfectadas

Como se muestra en la figura 16(a), tanto la fusión del monómero FcγRIIars a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) como la fusión del monómero FcγRIIars a ASH se capturan y pueden detectarse en este ensayo. Como se muestra en la figura 16(b) tanto la fusión del dímero de FcγRIIars a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) como la fusión del dímero de FcγRIIars a ASH se capturan también y pueden detectarse en este ensayo. Evidentemente, tanto el epítipo 8.2 utilizado para capturar estos receptores como el epítipo 8.7 utilizado para detectar los receptores capturados están intactos lo que indica un plegamiento correcto de las fusiones.

Exposición

Los montajes de la fusión del monómero FcγRIIars y del dímero de FcγRIIars se expresaron desde el vector p-APEX 3P-xDST y se expresaron temporalmente en células CHOP y de manera estable en células 293E. Las fusiones expresadas se presentaron como proteínas distintas en la inmunotransferencia Western sin pruebas de productos de degradación.

La fusión del dímero de FcγRIIars a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A) puede presentar menores niveles de expresión que su contrapartida monomérica. Sin embargo, el nivel de expresión de la fusión de dímero de FcγRIIars a ASH fue casi equivalente al nivel de expresión de la fusión del monómero FcγRIIars a ASH, determinada por inmunotransferencia Western (figura 14), y por consiguiente es muy prometedora como medio para la producción a gran escala del dímero de FcγRIIars. A destacar que, las fusiones del dímero de FcγRIIars presentaban mayor actividad de unión de HAGG y del anticuerpo 8.2 anti-FcγRIIa que las contrapartidas monoméricas. Como se mencionó anteriormente, esto puede explicarse por el hecho de que las fusiones del dímero de FcγRIIars eran diméricas o tetraméricas (en el caso de la fusión de dímero de FcγRIIars a IgG-Fcγ1 (L234A, L235A)) para la región de unión a Fc, y como consecuencia, poseían una afinidad (avidez) de unión aparente mayor debido a su polivalencia. Se prevé que las moléculas tetraméricas puedan unirse a inmunocomplejos con afinidad tal que la unión sea sustancialmente irreversible.

EJEMPLO 4 Ingeniería y expresión de polipéptidos heterodiméricos del receptor Fc

Materiales y métodos

Construcción de los vectores de expresión heterodiméricos FcγRIIa-FcγRIII

La región de FcγRIIa y FcγRIII que se une a Fc puede ser ampliada independientemente por RCP a partir de la plantilla de ADNc utilizando cebadores apropiados como los descritos en el Ejemplo 1. Las regiones ampliadas comprenden los residuos característicos conocidos y los motivos de las regiones de unión a Fc tales como los residuos del enlazador del ectodominio 1 y del ectodominio 2 (es decir, la unión D1/D2) y los bucles CC, C'E y FG. Las secuencias polinucleotídicas para estas regiones de unión a Fc son bien conocidas por los expertos en la materia.

Los productos truncados de la RCP pueden ligarse utilizando T4 ADN ligasa en el vector pPIC9 (Invitrogen, Life Technologies) y completarse la secuencia *EcoRI* con el fragmento *Klenow* de ADN polimerasa I. Un polinucleótido heterodimérico FcγRIIa-FcγRIII fusionado funcionalmente puede crearse a partir de estos productos ampliados utilizando RCP similar y técnicas de clonación como las descritas en el Ejemplo 1. El tamaño y orientación de la inserción puede confirmarse mediante digestión analítica con enzima de restricción o secuenciado de ADN.

El polinucleótido heterodimérico fusionado funcionalmente puede clonarse en varios vectores de expresión. Por ejemplo, el polinucleótido heterodimérico FcγRIIa-FcγRIII puede ligarse en las secuencias *EcoRI/XbaI* del pBACPAK9 modificado (Invitrogen Life Tech.) en el que la secuencia *BamHI* en la secuencia de clonación múltiple había sido eliminada en primer lugar por digestión con *BamHI*, rellenando mediante la utilización del fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa y religadura. Los tamaños de la inserción pueden ser definidos por digestión con *EcoRI/XbaI* y la orientación correcta del fragmento *BamHI* de polimerización puede identificarse por digestión con *PvuII* utilizando los protocolos habituales.

Alternativamente, el polinucleótido heterodimérico FcγRIIa-FcγRIII puede clonarse en vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, la reacción con LR clonasa de Gateway (Invitrogen, Life Technologies) puede utilizarse para transferir de manera funcional los fragmentos de polinucleótido del receptor Fc polimérico fusionados de manera operativa en el vector de expresión pAPEX3P adaptado al casete A con marco de lectura GatewayTM (Invitrogen, Life Technologies) (Evans *et al.*, 1995; y Christiansen *et al.*, 1996) para dar los vectores de expresión de mamífero que expresan los polímeros del receptor Fc fusionado. Asimismo, la reacción de RL clonasa de Gateway puede utilizarse para transferir los fragmentos de polinucleótidos del receptor Fc polimérico fusionado funcionalmente en el vector de expresión pIRESneo (Clontech) adaptado a la casete A con marco de lectura GatewayTM (Invitrogen, Life Technologies).

Exposición

La polimerización de las regiones de unión a Fc generan moléculas con mayores interacciones de avidez con los dominios Fc. Cada monómero en el polímero puede interactuar independientemente con el dominio Fc de las inmunoglobulinas para proporcionar una avidez superior. Pueden generarse polímeros que contienen dominios que se unen a Fc procedentes de diferentes receptores Fc. Por ejemplo, podrían formarse polímeros a partir de las combinaciones de las regiones de unión a Fc de FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb, FcαRI y FcεRI. Podrían

formarse también heterodímeros a partir de las combinaciones de estas regiones de unión a Fc. Por ejemplo, podrían formarse los heterodímeros FcγRIIIa-FcγRIII, FcγRIIIa-FcγRI y FcγRI-FcγRIII, así como heterodímeros constituidos por otras combinaciones de las regiones de unión a Fc.

5 Los dominios que se unen a Fc de numerosos receptores de Fc se han definido por mutagénesis o
 cristalografía (IgG y FcγR: Maxwell *et al.*, 1999; Radaev *et al.*, 2001, Sondermann *et al.*, 2000, Hulett *et al.*, 1988, Hulett
et al., 1991, Hulett *et al.*, 1994, Hulett *et al.*, 1995; IgE y FcεRI: Garman *et al.*, 2000; IgA e interacciones de FcαRI: Wines
et al., 2001, Herr *et al.*, 2003). Además, se han realizado comparaciones de secuencias de FcR similares y el análisis
 10 comparativo de las estructuras del receptor de Fc (Sondermann *et al.*, 2001). Estos análisis demuestran que segmentos
 relacionados, claramente definidos de diferentes receptores de Fc son capaces de interactuar con sus ligandos.
 Además, el análisis cristalográfico ha demostrado esto claramente para la interacción de FcγRIIIa e IgG en la solicitud de
 patente internacional nº PCT/AU2006/000813 en comparación con los análisis cristalográficos de FcγRIII e IgG (Radaev
et al., 2001, Sondermann *et al.*, 2001).

15 Resulta evidente que estos datos junto con los experimentos de mutagénesis de otros receptores Fc indican
 que los segmentos de la región de conexión entre el ectodominio 1 y el ectodominio 2 de estos receptores Fc
 relacionados, así como los fragmentos de los bucles BC, C'E y FG de los segundos dominios de diferentes receptores,
 interactúan con sus respectivos ligandos. La incorporación de dichas regiones de unión a Fc en otros polipéptidos podría
 proporcionar especificidad para este tipo de inmunoglobulina en el nuevo polipéptido. Con esta finalidad, Hulett *et al.*,
 1991, Hulett *et al.*, 1995 y Maxwell *et al.*, 1999 han demostrado que la adición de las regiones de unión a IgG en las
 20 proteínas que sino no podrían unirse a IgG adquirieron especificidad para IgG. Asimismo, se ha apreciado que la
 inserción de una serie de secuencias que se unen a IgE en las proteínas que no pueden unirse a IgE dieron como
 resultado híbridos proteicos con especificidad de IgE tal como se describió anteriormente en el documento WO
 96/08512. Por consiguiente puede predecirse que, de manera similar, la inclusión de las regiones de unión a Fc que
 interactúan con IgG de FcγRI o FcγRIII en la proteína podrían proporcionar la función de unión a IgG a esta proteína, o
 del mismo modo, la inclusión de las regiones de unión a Fc que interactúan con IgA procedente de CD89 o FcαRI en
 25 una proteína podría proporcionar la función de unión de IgA a esta proteína. Dichas secuencias podrían incluir los bucles
 del primer dominio extracelular de FcαRI de CD89 que son conocidas por interactuar con IgA, dichos bucles incluirían
 los bucles BC, C'E y FG del dominio 1. Los restos importantes incluyen los aminoácidos 35, 52 y 81-86 (Wines *et al.*,
 2001, Herr *et al.*, 2003). De esta manera, son posibles las proteínas o péptidos receptores que contienen segmentos
 capaces de interactuar con diferentes clases de inmunoglobulinas.

30 En la presente memoria la palabra "comprenden" o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende"
 se apreciará que implican la inclusión de un elemento indicado, número entero o etapa, o un grupo de elementos,
 números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa o grupo de
 elementos, números enteros o etapas.

REFERENCIAS

- 35 1. Astier A *et al.* & D Hanau.1994. Human epidermal Langerhans cells secrete a soluble receptor for IgG (Fc gamma
 RII/CD32) that inhibits the binding of immune complexes to Fc gamma R+ cells. J Immunol.152(1):201.
2. Christiansen D *et al.* & BE Loveland. 1996. Engineering of recombinant soluble CD46: an inhibitor of complement
 activation. Immunology. 87:348.
3. Emery P *et al.* & G Seydoux. 2001. Rheumatology (Oxford) 40:699.
- 40 4. Evans MJ *et al.* & SP Squinto.1995. Rapid expression of an anti-human C5 chimeric Fab utilizing a vector that
 replicates in COS and 293 cells. J Immunol Methods. 1995 184:123.
5. Garman SC *et al.*, 2000. Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc epsilonRI
 alpha. Nature 406(6793):259-66.
- 45 6. Herr AB *et al.*, 2003. Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human Fc alphaRI
 and its complex with IgA1-Fc. Nature 423(6940):614-20.
7. Hibbs ML *et al.* & PM Hogarth. 1988. Molecular cloning of a human immunoglobulin G Fc receptor. Proc Natl Acad Sci
 USA 85 (7), 2240.
8. Hulett MD *et al.* & PM Hogarth.1991. Chimeric Fc receptors identify functional domains of the murine high affinity
 receptor for IgG. J Immunol. 47(6):1863-8.
- 50 9. Hulett MD *et al.* & PM Hogarth 1994. Identification of the IgG binding site of the human low affinity receptor for IgG Fc
 gamma RII. Enhancement and ablation of binding by site-directed mutagenesis. J Biol Chem. 269(21):15287.
10. Hulett MD *et al.* & PM Hogarth. 1995. Multiple regions of human Fc gamma RII (CD32) contribute to the binding of
 IgG. J Biol Chem. 270(36):21188.

11. Hulett MD & PM Hogarth. 1998. The second and third extracellular domains of Fc γ RI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol.* 35(14-15):989.
12. Ierino FL *et al.* & PM Hogarth. 1993a. Rec. soluble human Fc γ RII: prodn, characterization, and inhibition of the Arthus reaction. *J Exp Med* 178:1617.
- 5 13. Ierino FL *et al.* & PM Hogarth. 1993b. Mapping epitopes of human Fc gamma RII (CDw32) with monoclonal antibodies and recombinant receptors. *J. Immunol.* 150:1794-803.
14. Lau LM *et al.* & DE Jackson. 2004. The tetraspanin superfamily member CD151 regulates outside-in integrin α IIb β 3 signaling and platelet function. *Blood.* 104(8):2368.
- 10 15. Maxwell KF *et al.* & PM Hogarth. 1999. Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc gammaRIIa. *Nat Struct Biol* 6:437.
16. Nabbe KC *et al.* & WB van den Berg. 2003. Coordinate expression of activating Fc gamma receptors I and III and inhibiting Fc gamma receptor type II in the determination of joint inflammation and cartilage destruction during immune complex-mediated arthritis. *Arthritis Rheum* 48:255.
- 15 17. Pflum LR & ML Graeme. 1979. The Arthus reaction in rats, a possible test for anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs. *Agents Actions* 9:184.
18. Powell MS *et al.* & PM Hogarth. 1999. Biochemical analysis and crystallisation of Fc gamma RIIa, the low affinity receptor for IgG. *Immunol Lett.* 68(1):17.
19. Radaev S *et al.*, 2001. The structure of a human type III Fc γ receptor in complex with Fc. *J. Biol. Chem.* 276(19):16469-77.
- 20 20. Sondermann P *et al.*, 2000. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* 406(6793):267-73.
21. Sondermann P *et al.*, 2001. Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J. Mol. Biol.* 309(3):737-49.
22. Takai T. 2002. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2(8):580.
- 25 23. Tamm A *et al.* & RE Schmidt RE. 1996. The IgG binding site of human Fc γ RIIIb receptor involves CC' and FG loops of the membrane-proximal domain. *J Biol Chem.* 271(7):3659.
24. Thai LeM *et al.* & DE Jackson. 2003. Physical proximity and functional interplay of PECAM-1 with the Fc receptor Fc gamma RIIa on the platelet plasma membrane. *Blood.* 102(10):3637.
- 30 25. Wines BD & SB Easterbrook-Smith. 1988. Enhancement of the binding of C1q to immune complexes by polyethylene glycol. *Mol Immunol.* 25(3):263.
26. Wines BD *et al.* & PM Hogarth. 2000. The IgG Fc contains distinct Fc receptor (FcR) binding sites: the leukocyte receptors Fc gamma RI and Fc gamma RIIa bind to a region in the Fc distinct from that recognized by neonatal FcR and protein A. *J. Immunol.* 164:5313-8
- 35 27. Wines BD *et al.* & PM Hogarth. 2001. The interaction of Fc alpha RI with IgA and its implications for ligand binding by immunoreceptors of the leukocyte receptor cluster. *J Immunol.* 166(3):1781.
28. Wines BD *et al.* & PM Hogarth. 2003. Soluble Fc γ RIIa inhibits rheumatoid factor binding to immune complexes. *Immunology.* 109(2):246.
29. Wright JK *et al.* & JC Jaton. 1980. Preparation and characterization of chemically defined oligomers of rabbit immunoglobulin G molecules for the complement binding studies. *Biochem J.* 187(3):767.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Trillium Therapeutics Inc

<120> Polipéptidos poliméricos para los receptores Fc

<130> 30109PCT

<160> 6

45 <170> PatentIn versión 3.3

	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 1	
	gtagctcccc caaaggctg	19
	<210> 2	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	
	ctacccgggt gaagagctgc ccatg	25
	<210> 3	
	<211> 48	
15	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 3	
	tctcatcacc accatcacca cgtctagacc cagcttctt gtacaaag	48
	<210> 4	
20	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> enlazador sintético	
25	<400> 4	
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
	₁ ₅ ₁₀	
	<210> 5	
	<211> 1206	
	<212> ADN	
30	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	

atggagacc aaatgtctca gaatgtatgt cccagaaacc tgtggctgct tcaaccattg 60
 acagttttgc tgctgctggc ttctgcagac agtcaagctg cagctcccc aaaggctgtg 120
 ctgaaacttg agccccctg gatcaacgtg ctccaggagg actctgtgac tctgacatgc 180
 cagggggctc gcagccctga gagcgactcc attcagtggg tccacaatgg gaatctcatt 240
 cccaccaca cgcagcccag ctacagggtc aaggccaaca acaatgacag cggggagtac 300
 acgtgccaga ctggccagac cagcctcagc gaccctgtgc atctgactgt gctttccgaa 360
 tggctggtgc tccagacccc tcacctggag ttccaggagg gagaaacat catgctgagg 420
 tgccacagct ggaaggacaa gcctctggtc aaggtcacat tcttccagaa tggaaaatcc 480
 cagaaattct cccatttga tcccacctc tccatcccac aagcaaacca cagtcacagt 540
 ggtgattacc actgcacagg aaacataggc tacacgctgt tctcatcaa gcctgtgacc 600
 atcactgtcc aagtgccag catgggcagc tcttaccctg tagctcccc aaaggctgtg 660
 ctgaaacttg agccccctg gatcaacgtg ctccaggagg actctgtgac tctgacatgc 720
 cagggggctc gcagccctga gagcgactcc attcagtggg tccacaatgg gaatctcatt 780
 cccaccaca cgcagcccag ctacagggtc aaggccaaca acaatgacag cggggagtac 840
 acgtgccaga ctggccagac cagcctcagc gaccctgtgc atctgactgt gctttccgaa 900
 tggctggtgc tccagacccc tcacctggag ttccaggagg gagaaacat catgctgagg 960
 tgccacagct ggaaggacaa gcctctggtc aaggtcacat tcttccagaa tggaaaatcc 1020
 cagaaattct cccatttga tcccacctc tccatcccac aagcaaacca cagtcacagt 1080
 ggtgattacc actgcacagg aaacataggc tacacgctgt tctcatcaa gcctgtgacc 1140
 atcactgtcc aagtgccag catgggcagc tcttaccct ctcacacca ccatcaccac 1200
 gtctag 1206

<210> 6

5 <211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

ES 2 359 218 T3

Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile
65 70 80

Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp
85 90 95

Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro
100 105 110

Val His Leu Thr val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His
115 120 125

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína o polipéptido polimérica/o soluble que puede inhibir la interacción de los receptores de leucocitos Fc γ (Fc γ R) y de inmunoglobulina G (IgG), comprendiendo dicha proteína o polipéptido dos regiones de unión a Fc enlazadas, por lo menos una de las cuales procede de un receptor de tipo Fc γ R, en la que dichas regiones de unión a Fc están enlazadas por un enlace peptídico o mediante una secuencia enlazadora corta en una disposición de cabeza con cola y en la que dicha proteína o polipéptido comprende únicamente dos regiones de unión a Fc enlazadas.
2. Proteína o polipéptido según la reivindicación 1, en la que dicha por lo menos una región de unión a Fc del receptor de tipo Fc γ R procede de un receptor de tipo Fc γ RII, preferentemente Fc γ RIIa.
- 10 3. Proteína o polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dichas regiones de unión a Fc enlazadas proceden de un receptor de tipo Fc γ R, preferentemente del mismo receptor de tipo Fc γ RII.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas regiones de unión a Fc están enlazadas mediante un enlazador que comprende 1 a 20 aminoácidos.
5. Polipéptido según la reivindicación 3 ó 4, que comprende además una proteína transportadora.
- 15 6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un dominio polipeptídico que puede unirse a otro dominio polipeptídico.
7. Polipéptido según la reivindicación 6, en el que dicho dominio polipeptídico es un dominio Fc de una inmunoglobulina.
8. Polipéptido según la reivindicación 7, en el que dicho dominio Fc procede de IgG₁ y ha sido modificado por la sustitución de Leu²³⁴ y/o Leu²³⁵.
- 20 9. Molécula de polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la proteína o el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Célula hospedadora recombinante que comprende la molécula de polinucleótido según la reivindicación 9.
11. Procedimiento de producción de una proteína o polipéptido, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
- 25 (i) proporcionar una célula hospedadora recombinante según la reivindicación 10,
- (ii) cultivar dicha célula hospedadora en un medio de cultivo adecuado y en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína o polipéptido polimérica/o soluble, y
- (iii) aislar dicha proteína o polipéptido polimérica/o soluble del medio de cultivo.
- 30 12. Proteína o polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su utilización en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
13. Proteína o polipéptido para su utilización en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria según la reivindicación 12, en la que dicha enfermedad inflamatoria se selecciona de entre el grupo constituido por artritis reumatoide (AR), púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI), lupus eritematoso diseminado (LED), glomerulonefritis y síndrome de trombosis trombocitopénica inducida por heparina (STTIH).

FIGURA 1

```

-31-30                                -20
atggagacccaaatgtctcagaatgtatgtcccagaaacctgtggctgcttcaaccattg
M E T Q M S Q N V C P R N L W L L Q P L
-10                                -1 +1
acagttttgctgctgctggcttctgcagacagtcaagctgcagctcccccagggtgtg
T V L L L L A S A D S Q A A A P P K A V
10                                20
ctgaaacttgagccccgtggatcaacgtgctccaggaggactctgtgactctgacatgc
L K L E P P W I N V L Q E D S V T L T C
30                                40
cagggggctcgcagccctgagagcgactccattcagtggttcacaatgggaatctcatt
Q G A R S P E S D S I Q W F H N G N L I
50                                60
cccaccacacgcagcccagctacaggttcaaggccaacaacaatgacagcggggagtac
P T H T Q P S Y R F K A N N N D S G E Y
70                                80
acgtgccagactggccagaccagcctcagcgcacctgtgcatctgactgtgctttccgaa
T C Q T G Q T S L S D P V H L T V L S E
90                                100
tggtggtgctccagaccctcacctggagtccaggaggagaaaccatcatgctgagg
W L V L Q T P H L E F Q E G E T I M L R
110                                120
tgccacagctggaaggacaagcctctggtcaagggtcacattcttccagaatggaaaatcc
C H S W K D K P L V K V T F F Q N G K S
130                                140
cagaaattctcccatttGGATCCcaccttctccatcccacaagcaaacacagtcacagt
Q K F S H L D P T F S I P Q A N H S H S
150                                160
ggtgattaccactgcacaggaacataggctacacgctggttctcatccaagcctgtgacc
G D Y H C T G N I G Y T L F S S K P V T
170                                180
atcactgtccaagtgccagcatgggcagctcttacccttagctcccccagggtgtg
I T V Q V P S M G S S S P V A P P K A V
190                                200
ctgaaacttgagccccgtggatcaacgtgctccaggaggactctgtgactctgacatgc
L K L E P P W I N V L Q E D S V T L T C
210                                220
cagggggctcgcagccctgagagcgactccattcagtggttcacaatgggaatctcatt
Q G A R S P E S D S I Q W F H N G N L I
230                                240
cccaccacacgcagcccagctacaggttcaaggccaacaacaatgacagcggggagtac
P T H T Q P S Y R F K A N N N D S G E Y
250                                260
acgtgccagactggccagaccagcctcagcgcacctgtgcatctgactgtgctttccgaa
T C Q T G Q T S L S D P V H L T V L S E
270                                280
tggtggtgctccagaccctcacctggagtccaggaggagaaaccatcatgctgagg
W L V L Q T P H L E F Q E G E T I M L R
290                                300
tgccacagctggaaggacaagcctctggtcaagggtcacattcttccagaatggaaaatcc
C H S W K D K P L V K V T F F Q N G K S
310                                320
cagaaattctcccatttGGATCCcaccttctccatcccacaagcaaacacagtcacagt
Q K F S H L D P T F S I P Q A N H S H S
330                                340
ggtgattaccactgcacaggaacataggctacacgctggttctcatccaagcctgtgacc
G D Y H C T G N I G Y T L F S S K P V T
350                                360
atcactgtccaagtgccagcatgggcagctcttaccctctcatcaccaccatcaccac
I T V Q V P S M G S S S P S H H H H H H
370
gtctag (SEC ID NO: 5)
V - (SEC ID NO: 6)

```

Caracterización de los polímeros de FcγRIIa

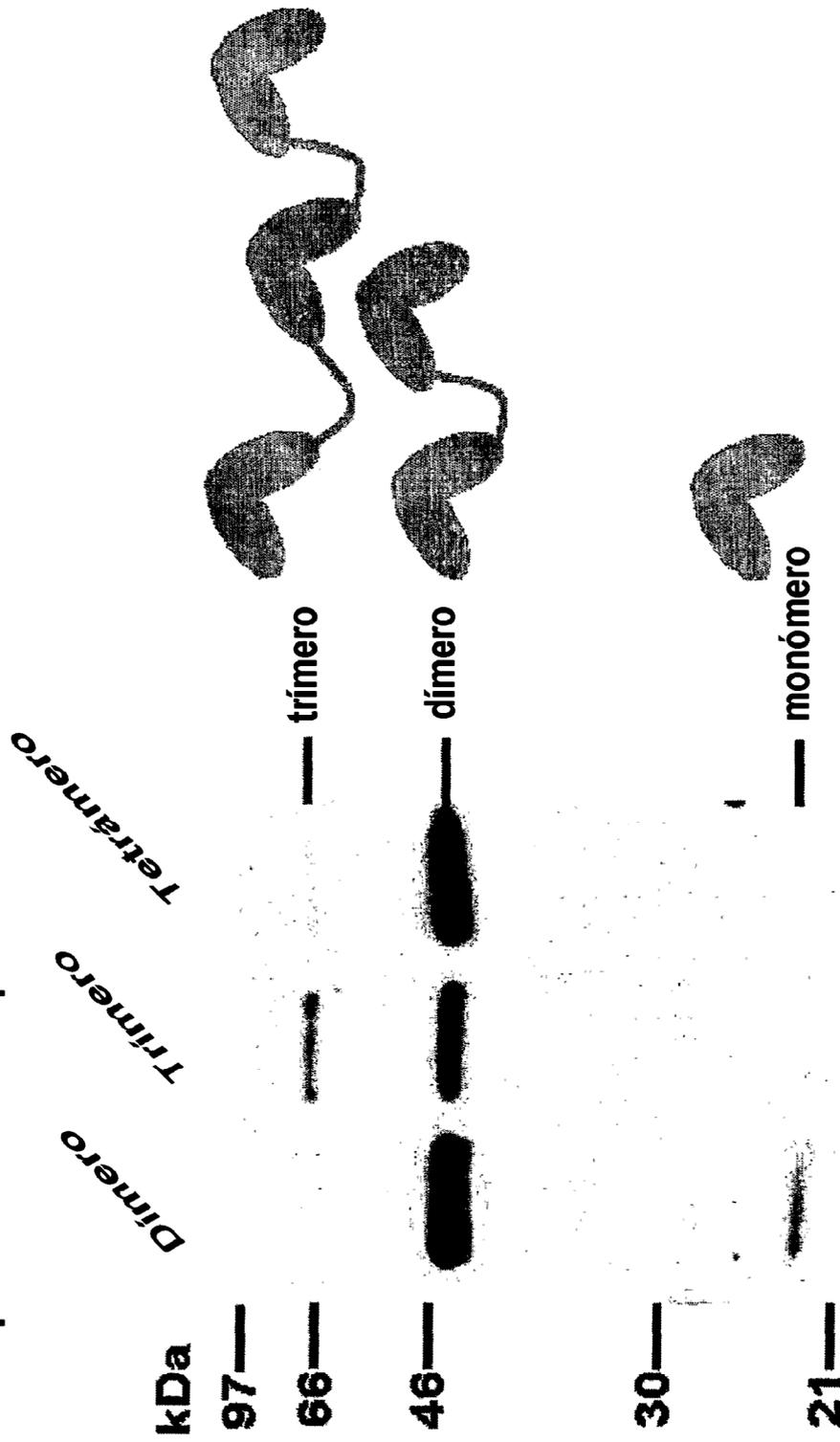


FIGURA 2

FIGURA 3b

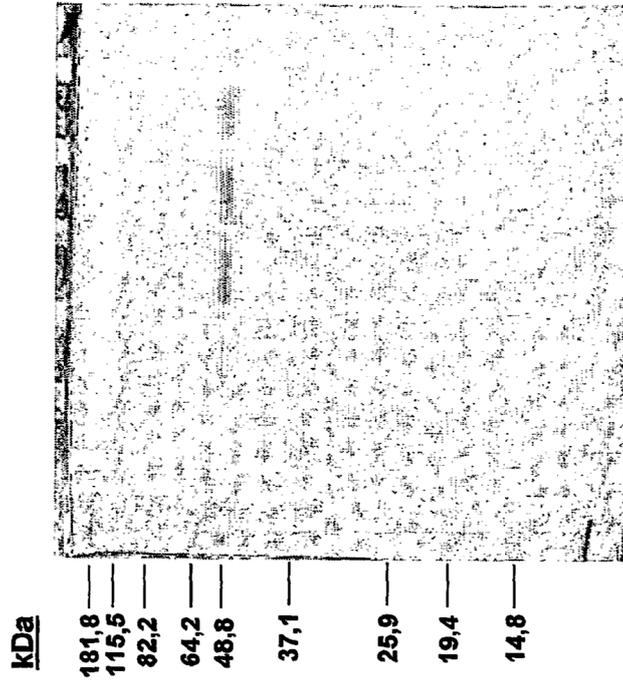


FIGURA 3a

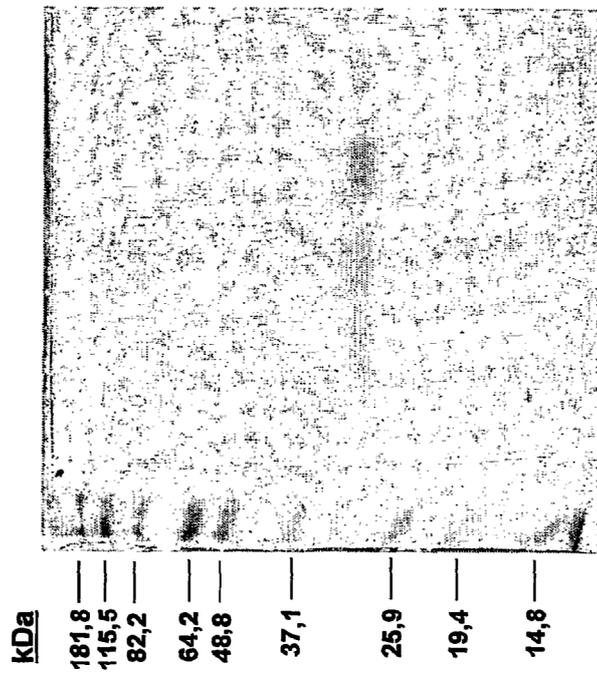


FIGURA 4b

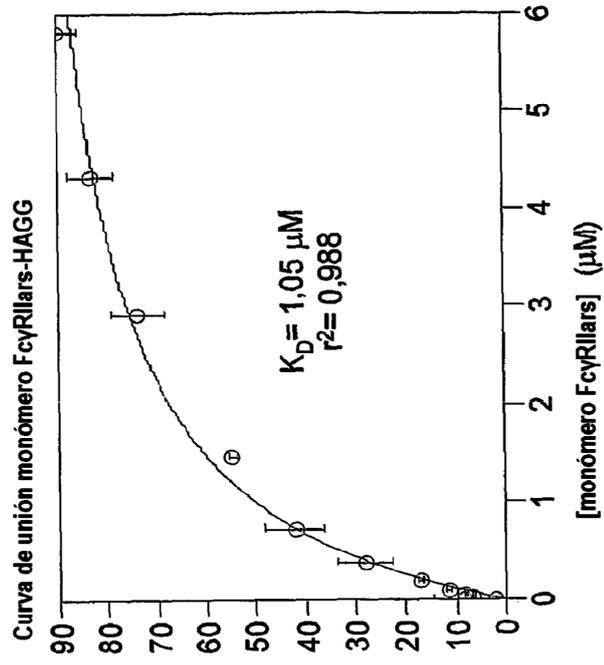


FIGURA 4a

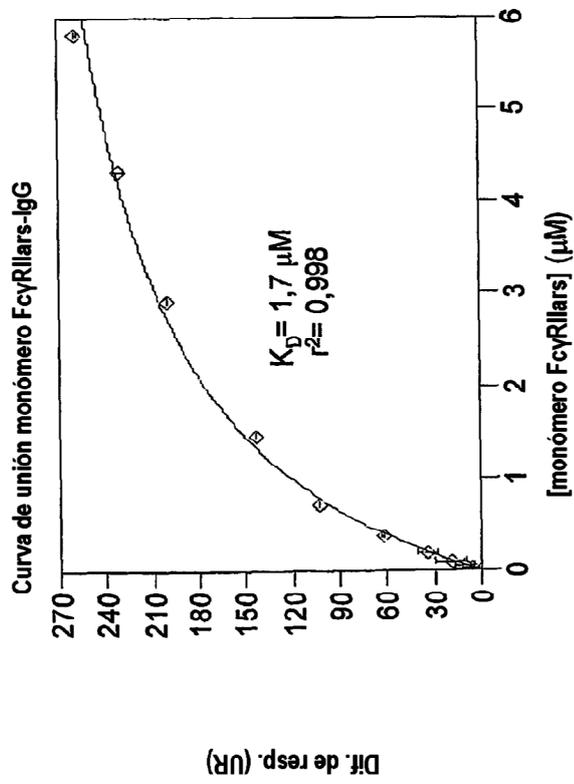


FIGURA 5b

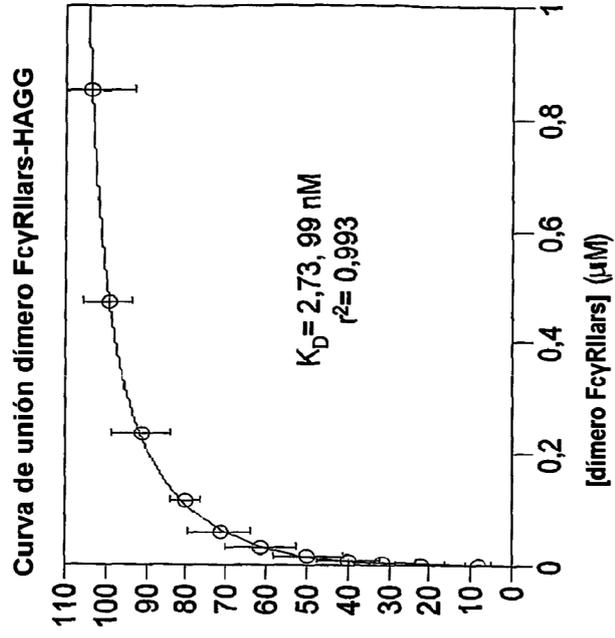


FIGURA 5a

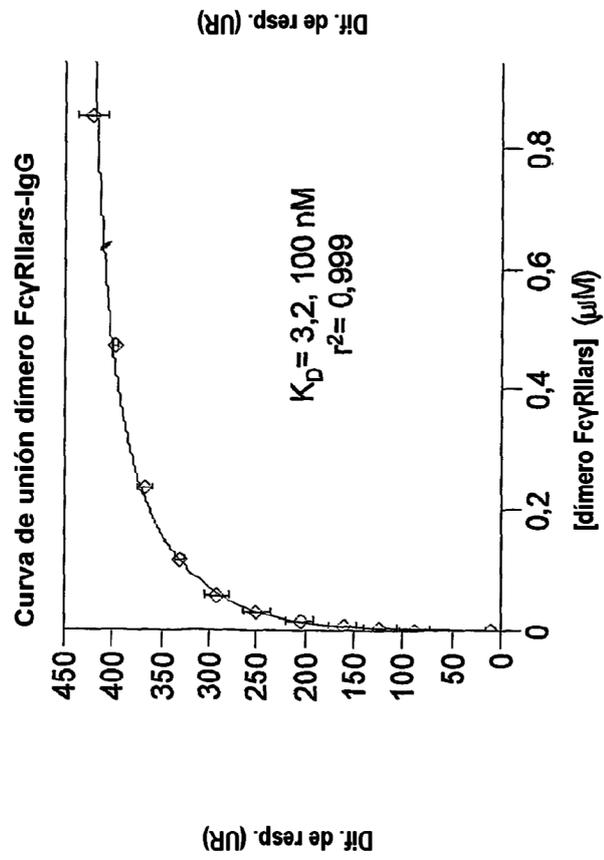


FIGURA 6a

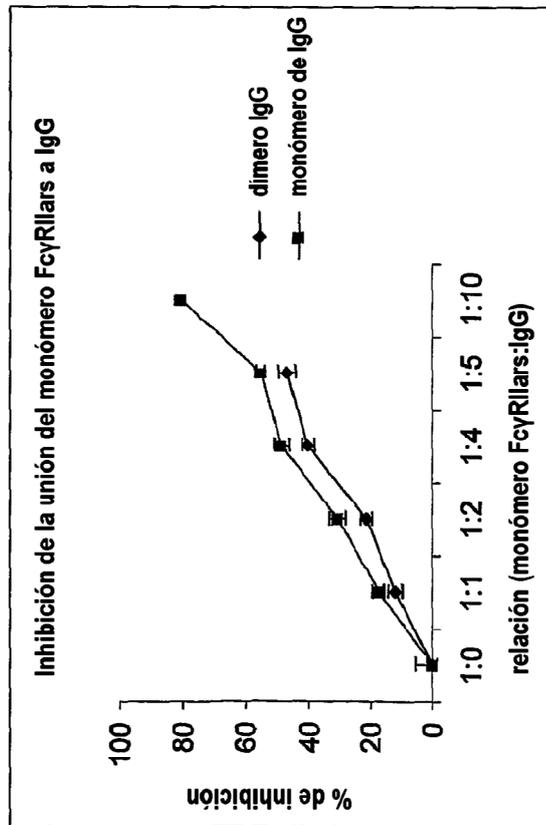


FIGURA 6b

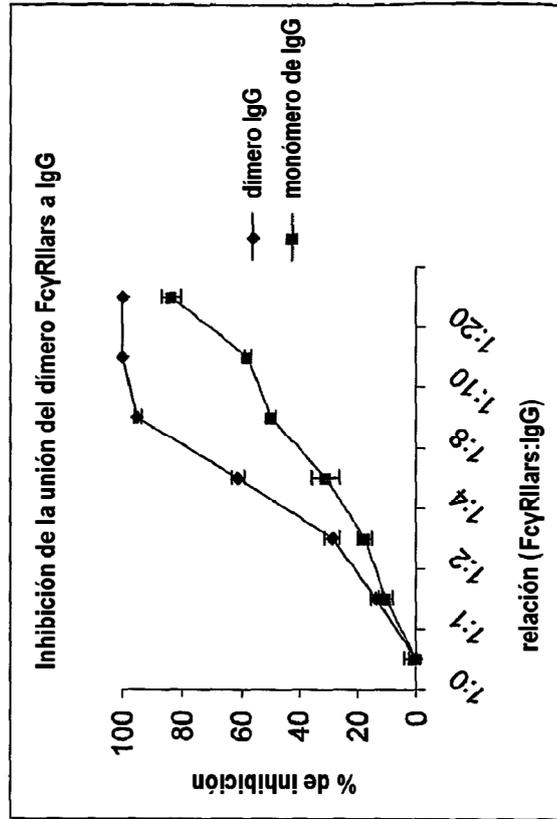


FIGURA 7a

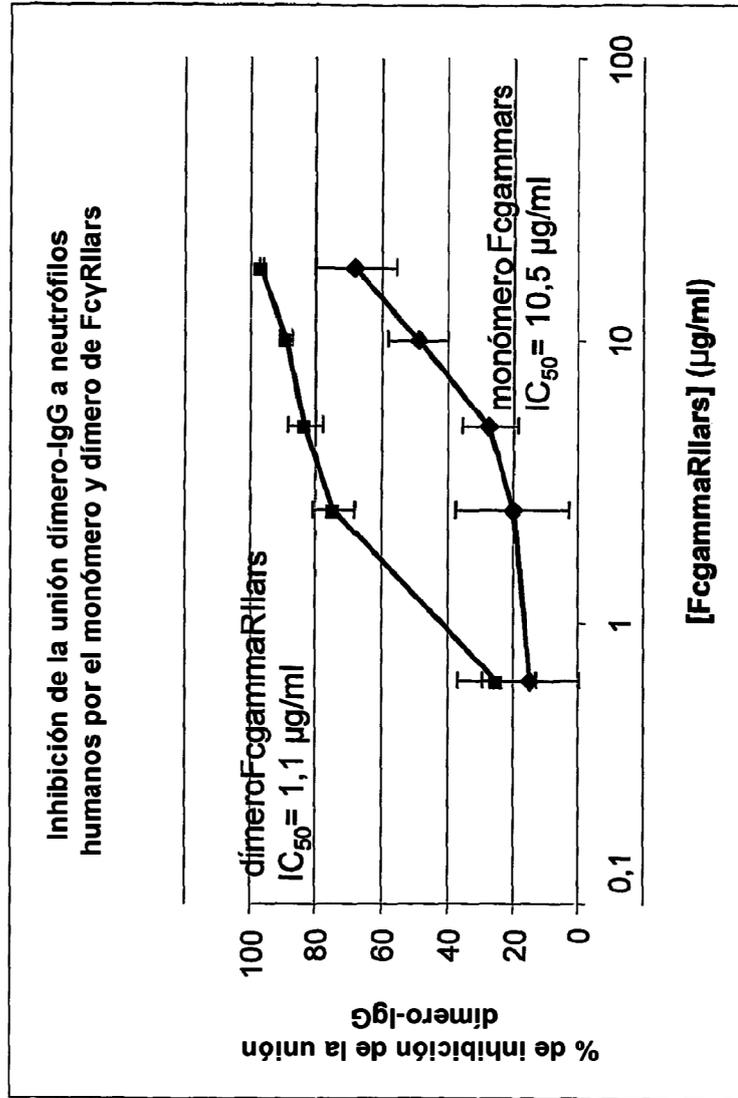


FIGURA 7b

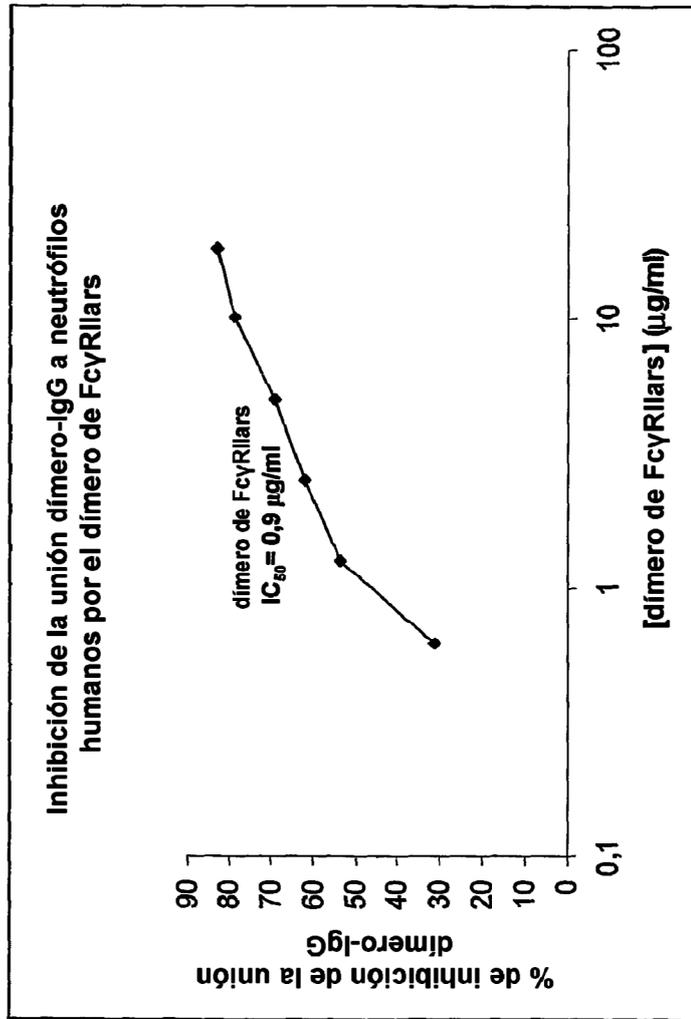


FIGURA 8b

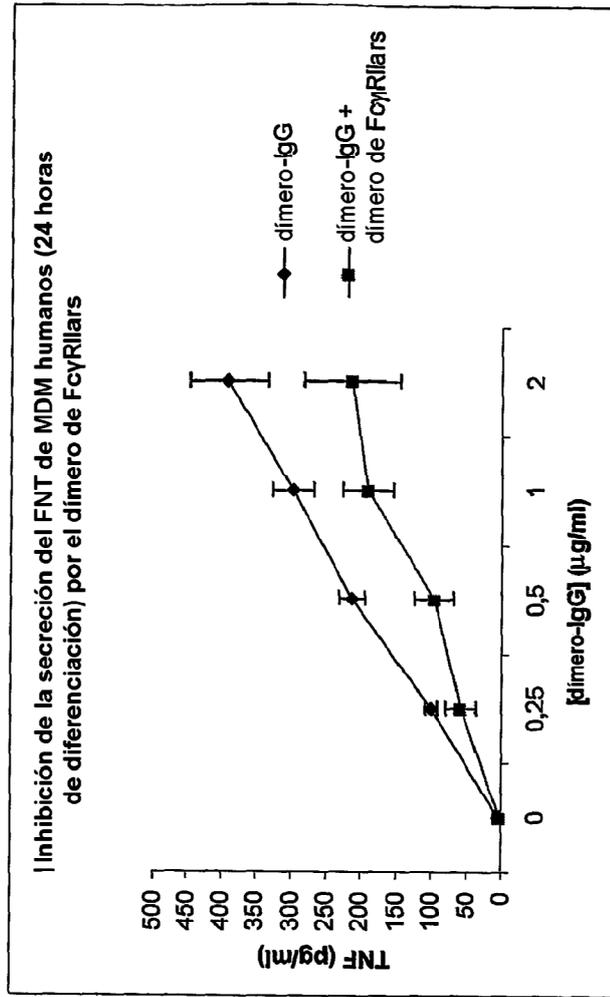
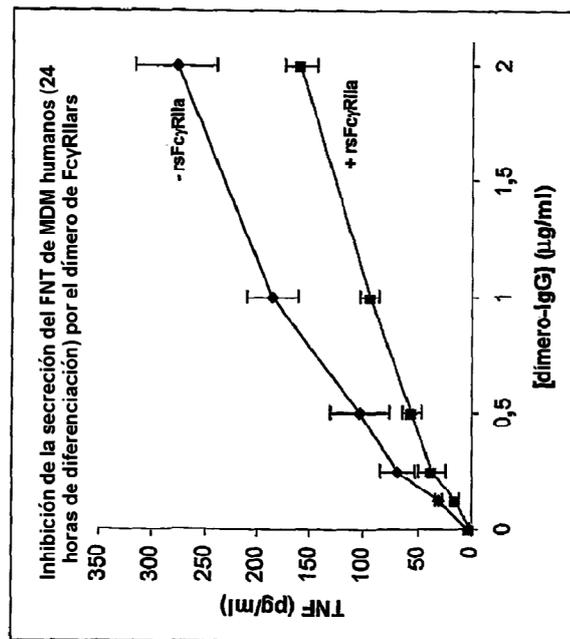


FIGURA 8a



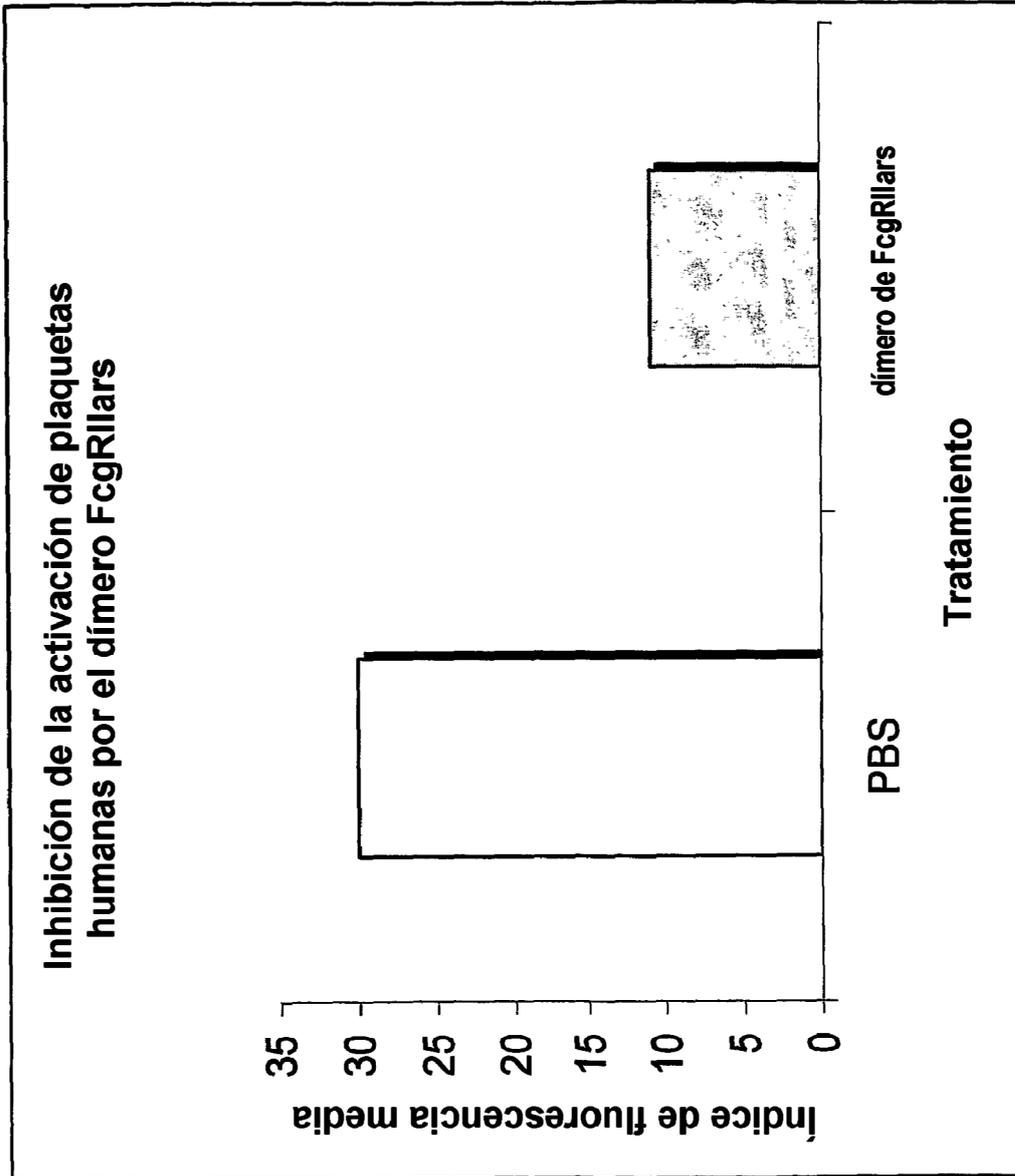


FIGURA 9

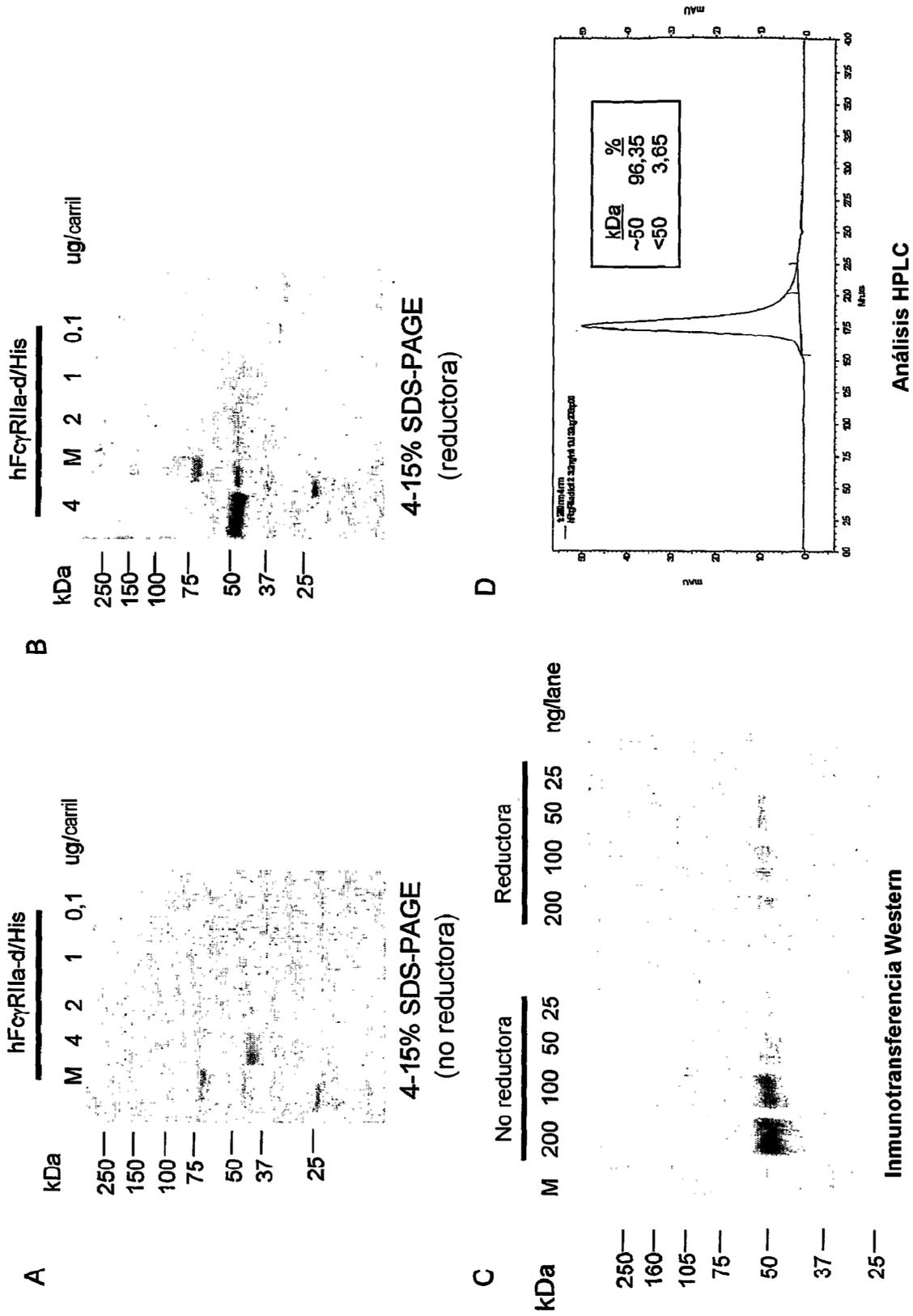


FIGURA 10

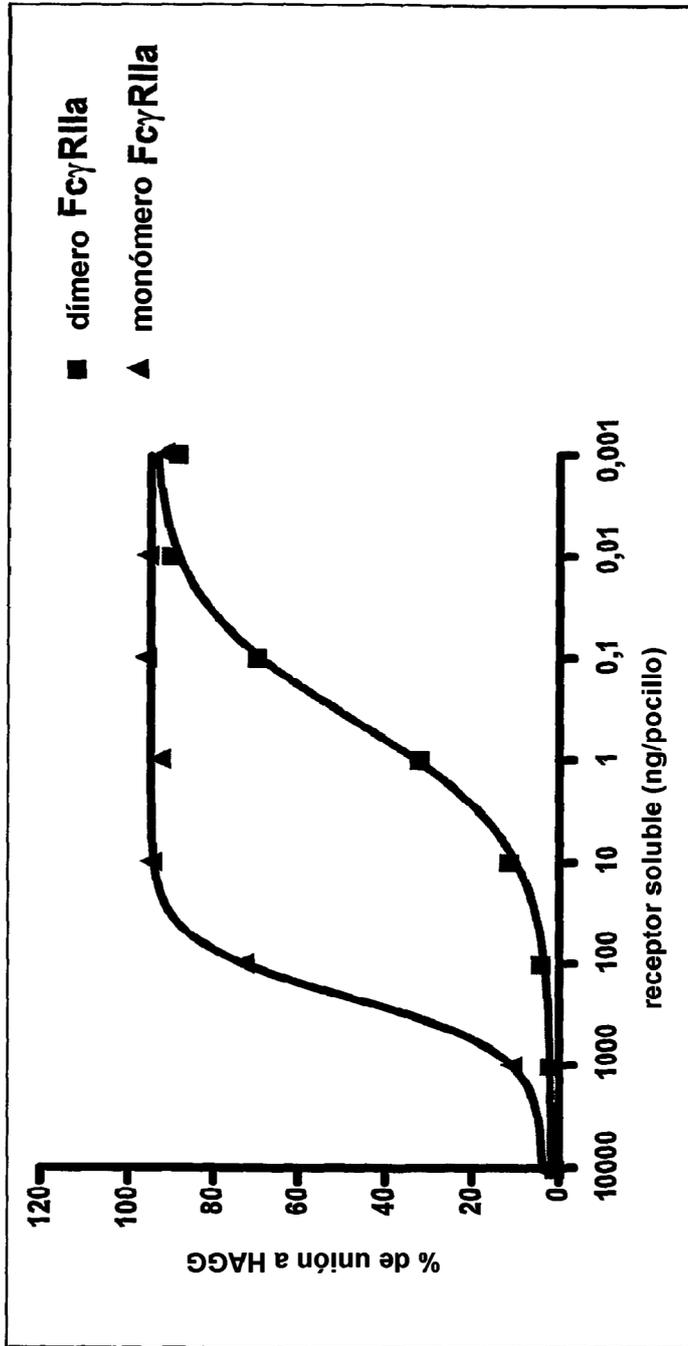


FIGURA 11

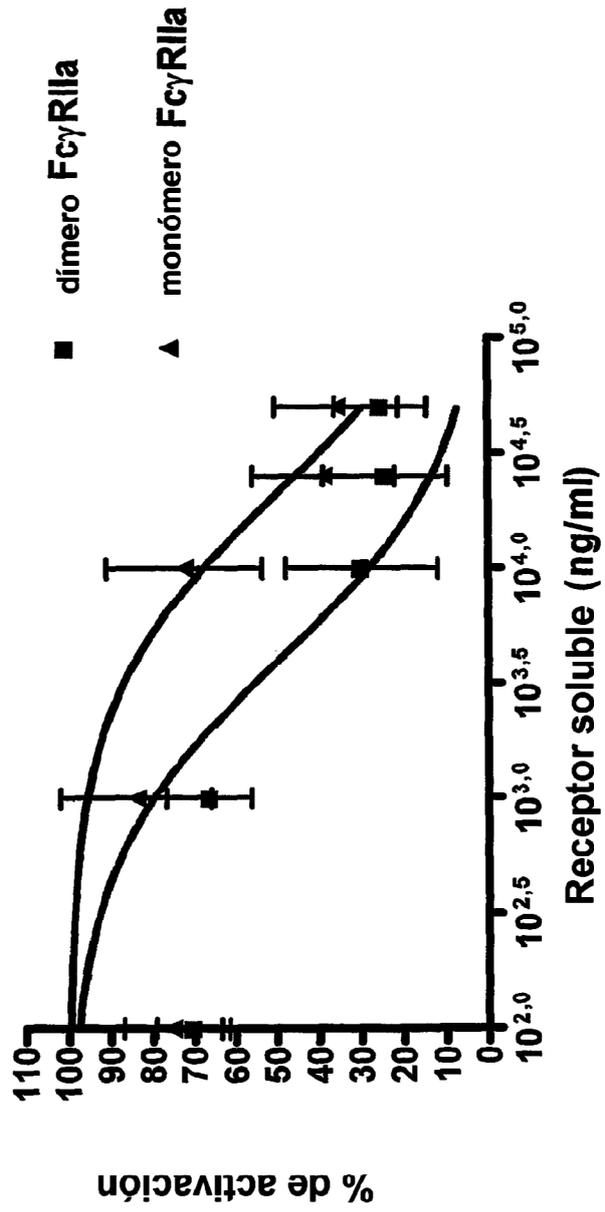


FIGURA 12

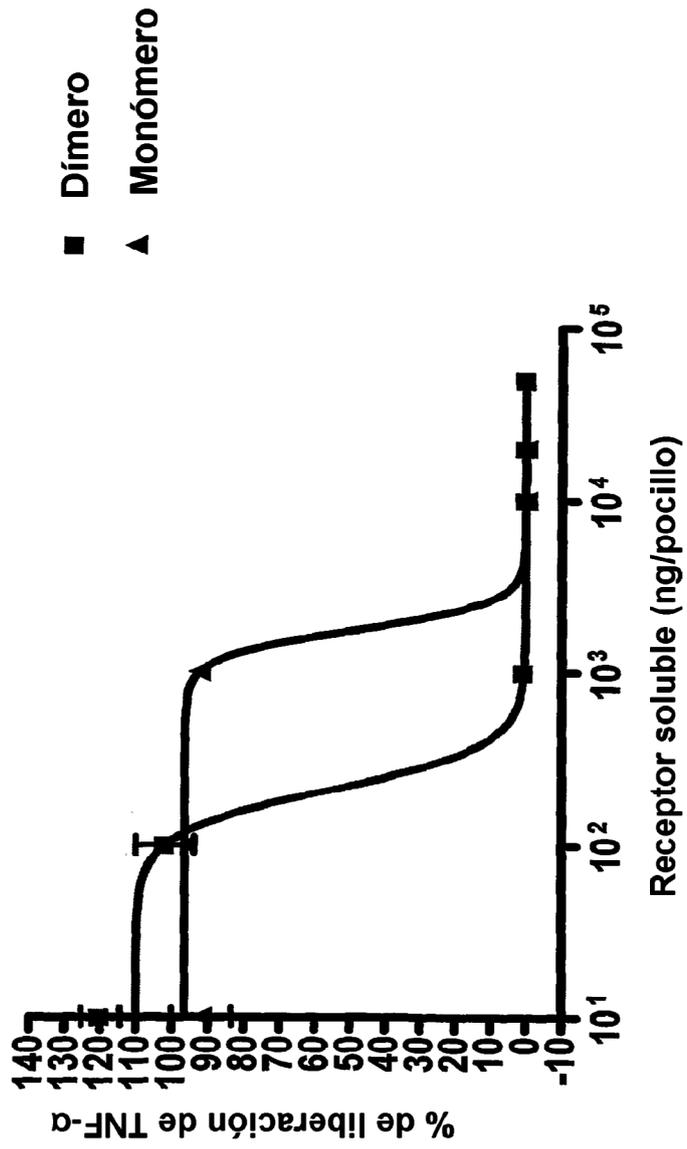


FIGURA 13

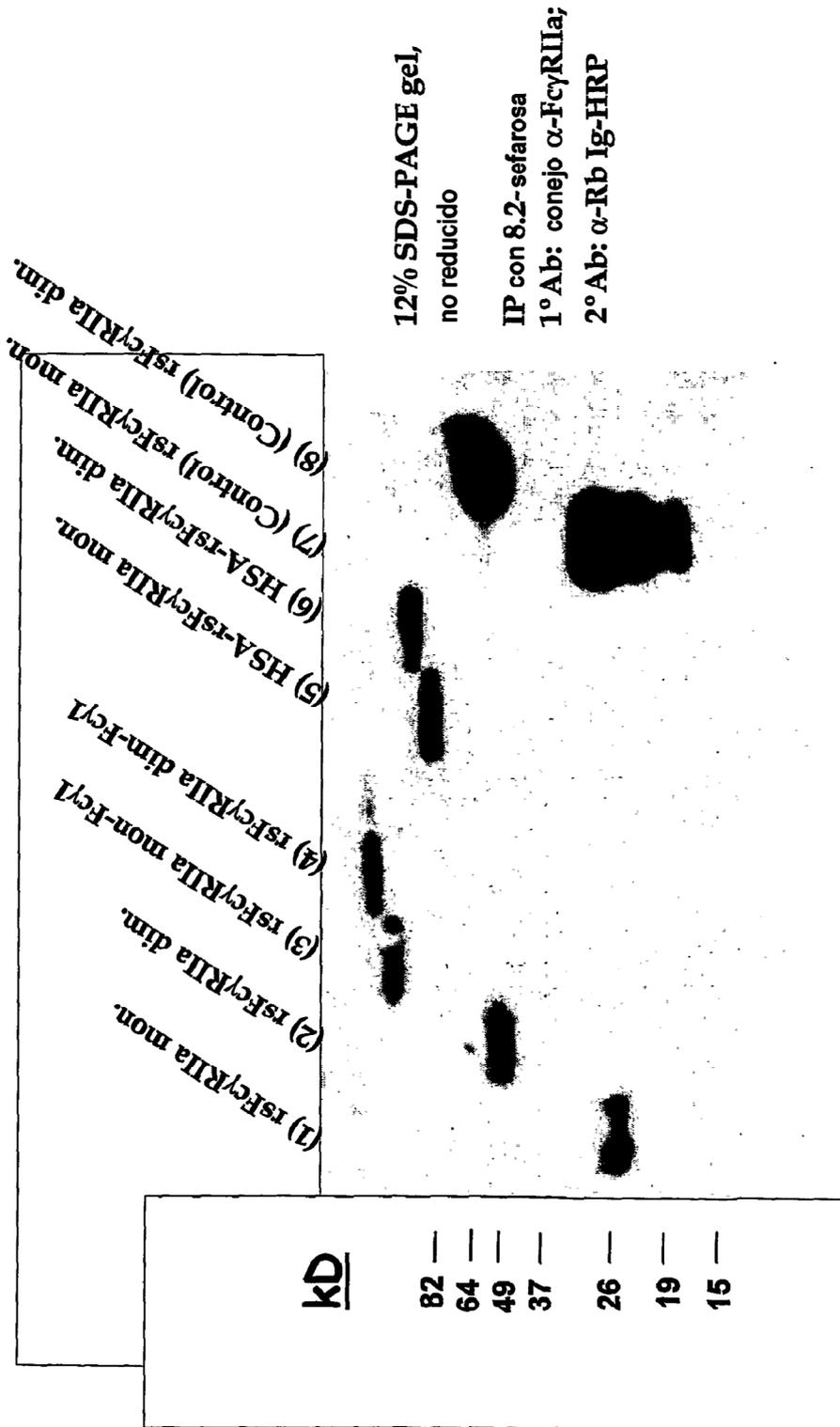
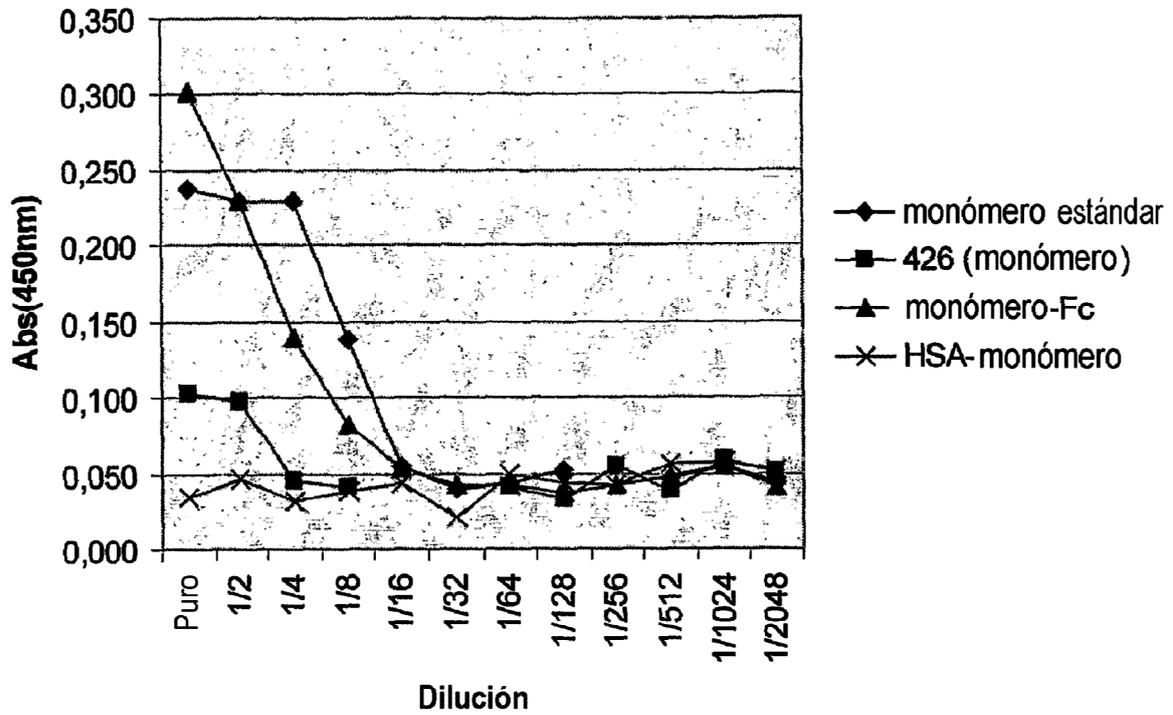


FIGURA 14

FIGURA 15

A

Valoración del "monómero" FcgRIIars de las células de CHOP



B

Valoración del "dímero" RcgRIIars de las células de CHOP

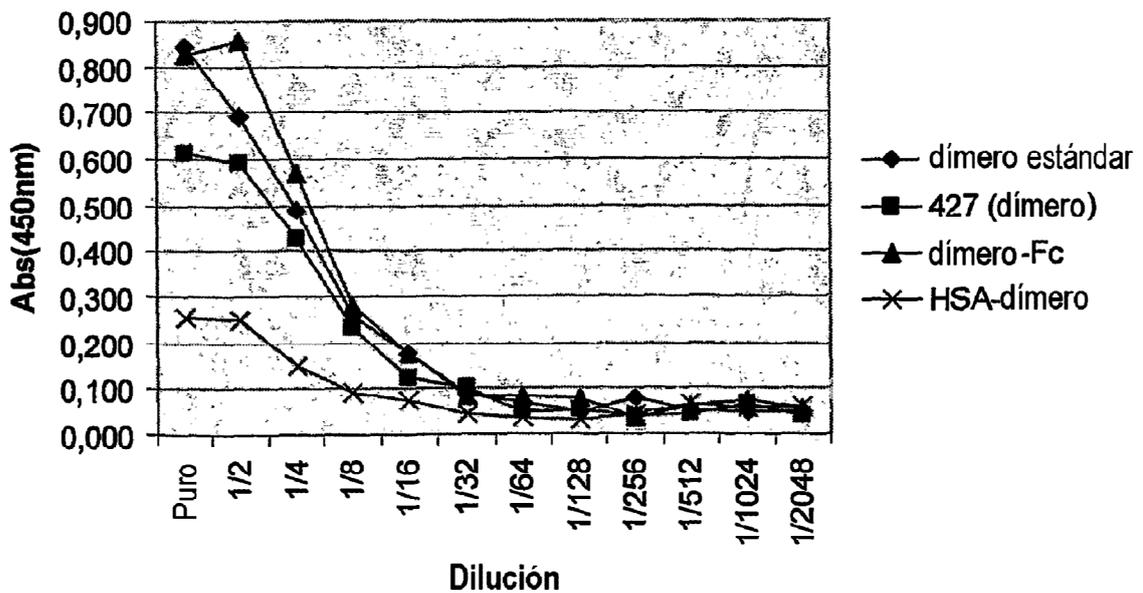
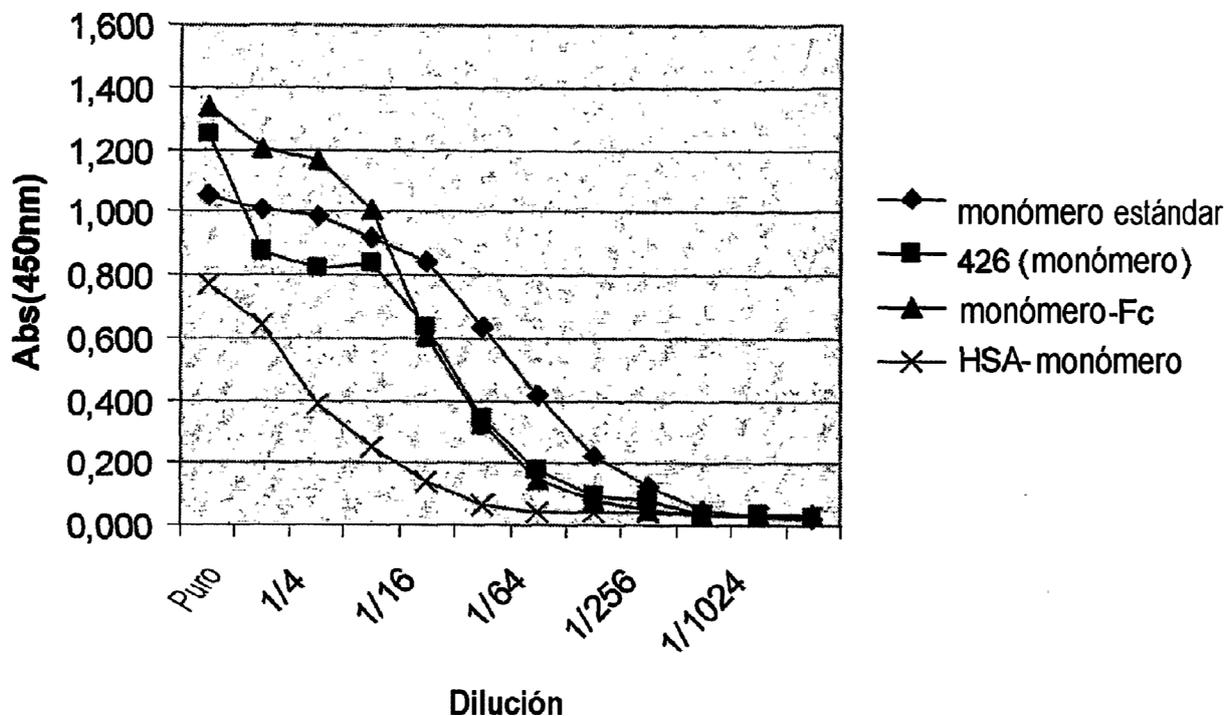


FIGURA 16

A

Valoración del monómero FcgRIIars de las células de CHOP



B

Valoración del dímero RcgRIIars de las células de CHOP

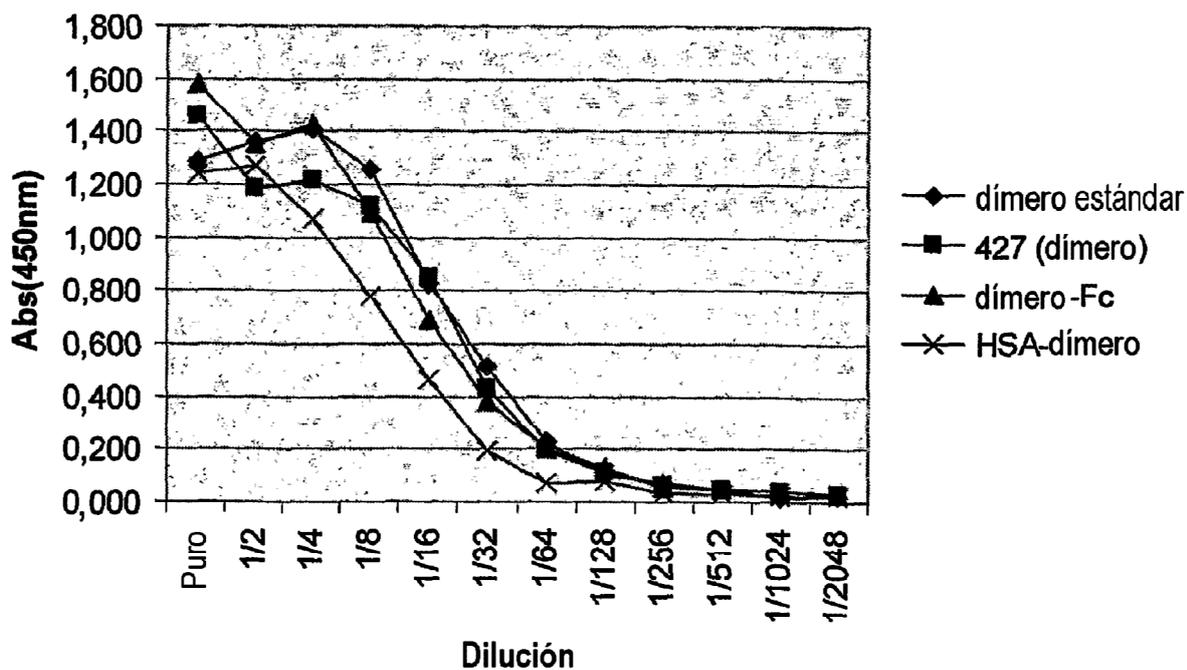
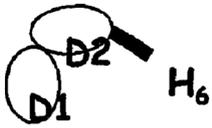
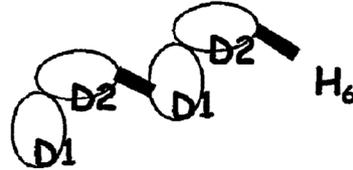


FIGURA 17

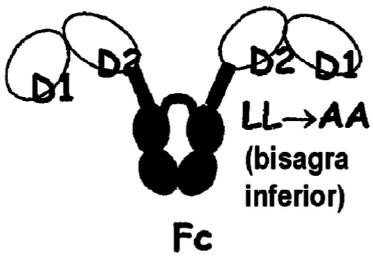
A



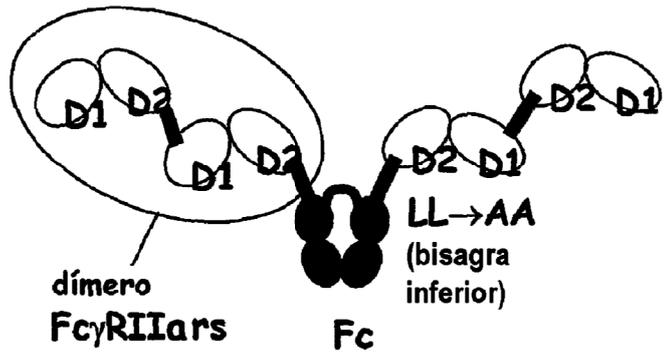
B



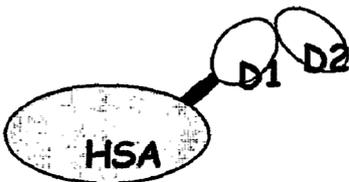
C



D



E



F

