(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 372 495**

(51) Int. Cl.:
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04800090 .5**
(96) Fecha de presentación: **13.11.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1682582**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

(54) Título: **MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN EN MASA DE LA REGIÓN CONSTANTE DE INMUNOGLOBULINA.**

(30) Prioridad:
13.11.2003 KR 2003080299

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.01.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.01.2012

(73) Titular/es:
Hanmi Holdings Co., Ltd
No 45, Bangi-dong Songpa-gu
Seoul 138-828, KR

(72) Inventor/es:
JUNG, Sung, Youb;
KIM, Jin, Sun;
PARK, Young, Jin;
CHOI, Ki-Doo;
KWON, Se, Chang y
LEE, Gwan, Sun

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).

ES 2 372 495 T3

DESCRIPCIÓN

Método para la producción en masa de la región constante de inmunoglobulina

Campo Técnico

La presente invención se relaciona con un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de señal de enterotoxina II estable al calor E. coli y una secuencia de nucleótido que codifica un región constante de inmunoglobulina, un transformante transformado con el vector de expresión, y un método para producción en masa de una región constante de inmunoglobulina al cultivar el transformante y expresar la región constante de inmunoglobulina en una forma soluble en agua.

Técnica Antecedente

Con los avances en la ingeniería genética, se han preparado y utilizado una gran número de fármacos de proteínas. Sin embargo, los fármacos de proteínas son susceptibles a desnaturalización o degradación proteolítica en el cuerpo, y es difícil sostener las concentraciones in vivo y títulos durante un largo periodo de tiempo. Es importante desarrollar una técnica para mantener las concentraciones in vivo de los fármacos de proteínas en niveles adecuados al mejorar la estabilidad de la proteína para promover la eficacia de la terapia, para ayudar a los pacientes que necesitan tomar su fármaco de proteína en inyecciones frecuentes y reducir el coste del tratamiento.

Se han hecho muchos intentos para mejorar la estabilidad in vivo de los fármacos de proteínas durante un largo tiempo, y tales intentos incluyen el cambio de una formulación de proteína, fusionar una proteína con otra proteína, o adherir químicamente o biológicamente un polímero adecuado a la superficie de una proteína.

Una de tales técnicas es elaborar una proteína de fusión con el fragmento Fc de inmunoglobulina.

El fragmento Fc media las funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), así como también la capacidad de unión a antígeno que es la función única de las inmunoglobulinas. También, el fragmento Fc contiene una secuencia que participa en la unión al receptor Fc neonatal (FcRn), que cumple una función en la regulación de los niveles IgG de suero al incrementar el transporte del IgG maternal a los neonatos y la vida útil del IgG (Ghetie and Ward, Immunology Today 18: 592-598, 1997), y la secuencia regula la interacción entre la proteína A y la proteína G. A través de la fusión de este fragmento Fc con una proteína terapéutica, se han realizado muchos estudios para mejorar la estabilidad de la proteína terapéutica.

Por ejemplo, la Patente Coreana No. 249572 describe una proteína de fusión que se prepara al ligar una región constante de cadena pesada IgG1 (Fc) en un extremo de terminal amino del mismo a un extremo de terminal carboxilo de una proteína, tal como el receptor IL4, receptor IL7, receptor G-CSF o receptor EPO, y producir la proteína de fusión resultante en células de mamífero. La Patente Estadounidense No. 5,605,690 describe una proteína de fusión que comprende el receptor del factor de necrosis de tumor fusionado en su extremo de terminal carboxilo a un derivado Fc IgG1 humano, la proteína de fusión se produce en células de animal. También, Tanox Inc. reporta en la Patente Estadounidense Nos. 5,723,125 y 5,908,626 que una molécula híbrida comprende interferón alfa o beta humano ligado a su extremo de terminal carboxilo al Fc humano natural a través de un ligador de péptido y se produce en células de animal. Lexigen Inc., como describe en la Publicación de Solicitud PCT Internacional No. WO 00/69913, prepara un Fc IgG1 natural ligado a su extremo de terminal carboxilo al extremo de terminal amino de interferón humano mediante recombinación genética sin el uso de un ligador y produce la proteína de fusión en células de animal. La Publicación de Patente Estadounidense No. 20030082679 describe una proteína de fusión con una vida útil de suero extendida, que comprende G-CSF humano ligado a su extremo de terminal carboxilo al extremo de terminal amino de Fc IgG1 y se produce en células de animal. La Publicación de Patente Estadounidense No. 20010053539, Patente Estadounidense No. 6,030,613, la Publicación de Solicitud PCT Internacional Nos. WO 99/02709 y WO 01/03737 y Patente Europea No. 0464533B1 describe una proteína de fusión Fc con una vida útil de suero mayor que una proteína natural, que comprende un Fc IgG1 o derivado Fc ligado a su extremo de terminal amino a través de un ligador de péptido o sin un ligador de péptido al extremo de terminal carboxilo del EPO humano, TPO, hormona de crecimiento humana o interferón humano beta, la proteína de fusión Fc se produce en células de animal.

Estas proteínas de fusión Fc, como se describió anteriormente, aumentan la vida útil del suero de una proteína objetivo, pero son problemáticas en términos de mediar las funciones efectoras mediante el fragmento Fc (Patente Estadounidense No. 5,349,053). A través de las funciones efectoras del fragmento Fc, fijan los complementos o se unen a las células que expresan los FcyR, que conducen a lisis de las células específicas, e inducen la producción y secreción de diversas citoquinas que inducen la inflamación, que conduce a inflamación indeseada. También, la fusión crea una nueva secuencia de aminoácidos en una región de conexión entre el fragmento Fc y el socio de

proteína, que puede inducir potencialmente las respuestas inmunes luego de la administración durante un largo periodo.

A este respecto, se han hecho muchos esfuerzos para preparar una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina que tiene una vida útil del suero mayor pero que es deficiente en funciones efectoras. Cole et al. reporta que, cuando los residuos de aminoácido de la región CH2 en las posiciones 234, 235 y 237, se conocen por cumplir una función importante en la unión a los receptores Fc, que se reemplazan con alanina para producir un derivado Fc que tiene una afinidad de unión reducida a los receptores Fc, se inhibe la actividad ADCC (Cole et al., J. Immunol. 159: 3613-3621, 1997). Sin embargo, en todas estas variantes, el Fc puede haber incrementado la inmunogenicidad o antigenicidad comparado con el fragmento Fc humano natural debido a la presencia de aminoácidos inadecuados y puede perder las funciones Fc preferibles.

Entre los métodos para eliminar o reducir las funciones efectoras indeseables mientras se mantienen altas concentraciones de suero de una inmunoglobulina, una se basa en la remoción de unidades estructurales de azúcar de la inmunoglobulina. Como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,585,097, se puede preparar un derivado de anticuerpo aglucosilado como un anticuerpo anti-CD3 al reemplazar una residuo glucosilado de anticuerpos, el residuo asparagina en la posición 297 del dominio CH2, con otro aminoácido. Este derivado de anticuerpo aglucosilado exhibe funciones efectoras reducidas, pero aún retiene su afinidad de unión al receptor FcRn sin cambio de la vida útil del suero. Sin embargo, este derivado también es problemático en términos de que se reconoce potencialmente como un material extraño y es rechazado por el sistema inmune debido a la producción de una construcción recombinante novedosa que tiene una secuencia anormal. La Publicación de Patente Estadounidense No. 20030073164 describe un método para producir un derivado Fc utilizando E. coli desprovisto de la capacidad de glucosilación con el fin de preparar un anticuerpo terapéutico deficiente de las funciones efectoras.

La compañía Estadounidense Amgen Inc. describe, en la Patente Estadounidense No. 6,660,843 y la Publicación de Patente Estadounidense Nos. 20040044188 y 20040053845, un derivado Fc IgG1 humano que tiene eliminaciones de aminoácido en los primeros cinco residuos de aminoácido de la región bisagra, que se fusiona al extremo de terminal amino o carboxilo de una proteína terapéutica o una proteína terapéutica imitada por un péptido, y la producción del mismo utilizando un anfitrión E. coli. Sin embargo, esta proteína de fusión no tiene una secuencia de señal que se expresa como cuerpos de inclusión y así se puede someter a un proceso de replegado adicional. Este proceso de replegado de la proteína reduce los rendimientos, y especialmente en una proteína presente como un homodímero o un heterodímero, reduce notablemente la producción de dímero. También, cuando una proteína no tiene una secuencia de señal que se expresa en E. coli, se agrega un residuo metionina al terminal N del producto de expresión debido a la característica del sistema de expresión de la proteína de E. coli. Los productos de expresión mencionados anteriormente de Amgen Inc. tienen un residuo de metionina de terminal N, que puede inducir respuestas inmunes luego de la administración repetida o excesiva al cuerpo. También, debido a que estas moléculas de fusión se expresan en una forma de proteína de fusión en E. coli a través de ligar un gen que codifica un proteína terapéutica a un gen Fc, son difíciles de expresar en E. coli, o una proteína terapéutica es difícil de producir en E. coli si su expresión en E. coli en una forma fusionada resulta en una reducción significativa o pérdida de actividad. Adicionalmente, debido a que la fusión de las dos moléculas crea una secuencia de aminoácidos anormal que no ocurre en la naturaleza en la región de conexión entre las dos proteínas, la proteína de fusión se puede reconocer potencialmente como "no propia" por el sistema inmune y así induce las respuestas inmunes.

Para solucionar estos problemas, los actuales inventores previamente preparan un fragmento Fc y un fármaco de proteína como polipéptidos separados sin utilizar un método de fusión con base en recombinación genética pero utilizando los mejores sistemas de expresión y ligando convalentemente los dos polipéptidos junto con el uso del fragmento Fc como un portador de fármaco. En este caso, es posible preparar un conjugado de un fármaco de polipéptido glucosilado y un Fc aglucosilado, que no induce las respuestas inmunes indeseables pero que tiene propiedades satisfactorias de actividad de fármaco fisiológico, duración y estabilidad in vivo.

En el caso anterior, debido a que es preferible que el Fc esté en una forma aglucosilada, se utiliza un sistema de expresión procariótico tal como E. coli. Los métodos de producción de proteína utilizando un sistema de expresión E. coli tienen diversas ventajas comparado con métodos que utilizan células de animal, como sigue. Un vector de expresión E. coli se puede construir fácilmente, permitiendo así la evaluación rápida para la expresión de proteína. Debido a su índice de crecimiento rápido, el E. coli permite la producción en masa de una proteína de interés a bajo coste. También, se puede utilizar un proceso de expresión relativamente simple. Así, E. coli es más útil para la producción comercial que otras células anfitrionas.

Matsuda et al., Mol. Immunol. 27: 571-580, 1990, describe un método para producir un fragmento Fc recombinante en E. coli HB101 utilizando el plásmido pEXFC10 que contiene un péptido de señal (penicilinasa) y asegura la excreción del fragmento Fc. La proteína es el fragmento Fc de IgG1 y se utiliza para estudios de RMN. Kitai et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 52-56, 1988, describe un método para producir un fragmento Fc recombinante en E. coli utilizando el plásmido pEXFC10 que contiene un péptido de señal (penicilinasa) y asegura la excreción del fragmento Fc (D2, Fig. 2). La proteína es el fragmento Fc de IgG humano. Andrews et al. Gene, 182: 101-109, 1996,

describe la expresión de un polipéptido en E. coli, utilizando la secuencia de señal STII que conduce a expresión citoplásmica. La WO 031002144 A1 describe la expresión de un diacuerpo (di-scFv) en E. coli utilizando la secuencia de señal STII que conduce a expresión secretada.

Sin embargo, no hay reporte de un método útil industrialmente disponible para producción en masa de E. coli de las regiones constantes de inmunoglobulina que están presentes como cuerpos de inclusión luego de sobreexpresión en E. coli.

Por lo tanto, conduciendo a la presente invención, a la investigación intensa y a fondo en un método capaz de producir en masa las regiones constantes de inmunoglobulina tal como un fragmento Fc de inmunoglobulina, conducido por los actuales inventores, resulta en un hallazgo que, cuando una secuencia de nucleótido que codifica una región constante de inmunoglobulina tal como un fragmento Fc de inmunoglobulina expresado en E. coli en una forma fusionada a una secuencia de señal de enterotoxina II estable al calor E. coli, la región constante de inmunoglobulina no se expresa como cuerpos de inclusión sino en una forma soluble en agua en E. coli.

Descripción de la Invención

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar un método de producción en masa de una región constante de inmunoglobulina, que comprende transformar una célula procariótica con un vector de expresión recombinante que incluye una secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de señal de enterotoxina II estable al calor E. coli y una secuencia de nucleótido que codifica una región constante de inmunoglobulina; cultivar un transformante resultante; y aislar y purificar la región constante de inmunoglobulina expresada en una forma soluble en agua mediante el transformante.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una región constante de inmunoglobulina preparada mediante el método anterior.

Breve Descripción de los Dibujos

Los anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada en conjunto con los dibujos que la acompañan, en los que:

La FIGURA 1 muestra los resultados de Western blot del fragmento Fc de inmunoglobulina expresados en transformantes E. coli;

La FIGURA 2 muestra los resultados de SDS-PAGE reducido y no reducido del fragmento Fc dimérico de inmunoglobulinas expresadas en transformantes E. coli;

La FIGURA 3 muestra los resultados de SDS-PAGE reducido y no reducido del fragmento Fc monomérico de inmunoglobulinas expresadas en transformantes E. coli;

La FIGURA 4 muestra los resultados de ELISA para la capacidad de unión C1q del fragmento Fc de inmunoglobulinas expresadas en transformantes E. coli y una inmunoglobulina natural; y

La FIGURA 5 es una gráfica que muestra los resultados de análisis farmacocinético de un EPO natural, Aranesp y un conjugado Fc derivado con EPO-PEG-E. coli.

Mejor Modo para Llevar a Cabo la Invención

En un aspecto, la presente invención se relaciona con un método de producción en masa de una región constante de inmunoglobulina, que comprende transformar una célula procariótica con un vector de expresión recombinante que incluye una secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de señal de enterotoxina II estable al calor E. coli y una secuencia de nucleótido que codifica una región constante de inmunoglobulina; cultivar un transformante resultante; y aislar y purificar la región constante de inmunoglobulina expresada en una forma soluble en agua mediante el transformante.

Las inmunoglobulinas se dividen en regiones variables que realizan las funciones de anticuerpo de la unión específica a los antígenos y exhibe muchas variaciones en las secuencias, y regiones constantes que han fijado las secuencias y funciones efectoras, que incluyen activar el sistema de complemento, que confiere una capacidad de pasar a través de la placenta y actuar como ligandos para receptores en diversas células inmunes.

La presente invención se relaciona con un método de producción en masa de una región constante de inmunoglobulina útil como un portador para los fármacos de proteínas. La región constante de inmunoglobulina capaz de ser producida por la presente invención puede ser una forma natural aislada de los humanos y otros animales que incluyen cabras, cerdos, ratones, conejos, hámster, ratas y conejillos de indias, o puede ser un recombinante o un derivado de los mismos, obtenida de células de animal transformadas o microorganismos. Se puede preferir una región constante de IgG, IgA, IgM, IgE e IgD de humanos, o una combinación o híbrido de los mismos. El término "combinación", como se utiliza aquí, significa que los polipéptidos que codifican los fragmentos Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla del mismo origen se ligan a un polipéptido de cadena sencilla de un origen diferente para formar un dímero o multímero. El término "híbrido", como se utiliza aquí, significa que las secuencias que codifican dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulina de diferentes orígenes están presentes en un fragmento Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla. La inmunoglobulina puede ser preferiblemente una región constante de IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, o una combinación o híbrido de los mismos. En detalle, existen cinco tipos distintos de cadenas pesadas con base en las diferencias en las secuencias de aminoácido de sus regiones constantes: gama (γ), mu (P), alfa (α), delta (δ) y epsilon (ε), y las cadenas pesadas incluyen las siguientes subclases: gama 1 (γ1), gama 2 (γ2), gama 3 (γ3), gama 4 (y4), alfa 1 (α1) y alfa 2 (α2). También, existen dos tipos de cadenas ligeras con base en las diferencias en las secuencias de aminoácido de sus regiones constantes: tipos kappa (κ) y lambda (λ). Las secuencias de nucleótido que codifican la región constante de inmunoglobulina humana y el secuenciamiento de aminoácido que las limita, útiles en la presente invención, pueden ser aquellas codificadas por las secuencias de nucleótido de la base de datos GenBank y/o EMBL.

La región constante de cadena pesada de IgG, IgA, IgM, IgE consiste de tres dominios: CH1, CH2 y CH3, y la cadena pesada de IgM incluye adicionalmente CH4. La cadena ligera tiene un dominio constante, CL. La región constante de inmunoglobulina de la presente invención es una o más seleccionada del grupo que consiste de CH1, CH2, CH3, CH4 y los dominios CL. El dominio seleccionado puede ser completo o un fragmento del mismo (forma que tiene 30 o más eliminaciones de aminoácido). Por ejemplo, se puede seleccionar un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4; un dominio CH1 y un dominio CH2; un dominio CH1 y un dominio CH3; y un dominio CH2 y un dominio CH3. Sin embargo, la disposición de los dominios seleccionados no se limita específicamente.

La región constante de inmunoglobulina de la presente invención incluye un derivado de la secuencia de aminoácidos. El derivado de la secuencia de aminoácidos significa que tiene una secuencia en la que uno o más residuos de aminoácido difieren de una secuencia de aminoácidos tipo natural, y puede ocurrir de forma natural o se puede generar artificialmente. La región constante de inmunoglobulina incluye derivados que resultan de una eliminación, una inserción, una sustitución no conservante o conservante o combinaciones de los mismos. Típicamente se hace una inserción mediante la adición de una secuencia de aminoácidos consecutiva de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, o se puede hacer con una secuencia más larga. Típicamente una eliminación se hace en el rango de aproximadamente 1 a 30 residuos de aminoácido. Los intercambios de aminoácido en las proteínas y péptidos, que no alteran de manera general la actividad de las proteínas, o péptidos se conocen en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Los intercambios que ocurren más comúnmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, en ambas direcciones.

Se pueden preparar tales derivados mediante un método de síntesis de péptido químico o un método recombinante con base en la secuencia de ADN, que se conocen en la técnica (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2d Ed., 1989).

Adicionalmente, la región constante de inmunoglobulina, si se desea, se puede modificar mediante fosforilación, sulfación, acrilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, y similares.

La presente invención puede incluir una región bisagra que permite la formación de un dímero. La región bisagra puede incluir, además de una forma natural, derivados mediante una eliminación, una inserción, una sustitución conservadora o no conservadora o combinaciones de los mismos.

El derivado de inmunoglobulina de la presente invención es preferiblemente un equivalente funcional en su forma natural que tiene una actividad biológica similar, o, si se desea, se puede hacer al alterar la propiedad de forma natural. Preferiblemente, los derivados de la región constante de inmunoglobulina son proteínas que tiene estabilidad estructural incrementada contra el calor, pH, etc., o solubilidad, o que tiene características mejoradas en términos de formación de enlace de disulfuro, compatibilidad con un anfitrión de expresión, unión de complemento, unión del receptor Fc y citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), mientras que los derivados producidos no inducen las respuestas inmunes indeseadas en humanos y animales. Los derivados preferidos son como sigue.

(1) Se puede retirar un residuo cisteína en una región bisagra, responsable de la formación de enlace de disulfuro. Preferiblemente, doce residuos entre quince aminoácidos de la región bisagra de IgG1, del 1er aminoácido, Glu, al

décimo segundo aminoácido, Pro, se puede eliminar para retirar dos residuos cisteína. También, nueve residuos entre doce aminoácidos de la región bisagra de IgG4, del 1er aminoácido, Glu, al noveno aminoácido, Pro, se puede eliminar para retirar un residuo cisteína. Esta remoción del residuo cisteína evita la asociación con otras proteínas que contienen cisteína en células anfitrionas, mejorando así los niveles de expresión y la estabilidad en una forma soluble en agua.

(2) Una región constante IgG1 se puede alterar en un residuo específico que tiene afinidad reducida a los receptores Fc que median la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC). Un derivado producido puede contener una eliminación o un reemplazo con otro aminoácido en el residuo leucina en la posición 234 de una secuencia IgG1 CH2 (ver, la secuencia de la base de datos Kobat para la numeración de los residuos de aminoácido). Más preferiblemente, se reemplaza Leu234 por fenilalanina, un residuo de aminoácido en la posición correspondiente en IgG4. Tal derivado no es una secuencia desconocida para los humanos, y así no se espera que induzca respuestas inmunes cuando se administra a los humanos.

(3) Un derivado de una región bisagra IgG1 puede contener una sustitución en el primer aminoácido, prolina. Un residuo prolina, probablemente otros residuos de aminoácido forman una estructura de anillo cerrada. Si está presente la prolina en un extremo de terminal amino, esta puede afectar negativamente la expresión de la proteína y la eliminación de una secuencia de señal. A este respecto, el residuo prolina se puede reemplazar por otro aminoácido, preferiblemente serina, un residuo de aminoácido en la posición correspondiente en IgG4. Como se notó anteriormente, este derivado no es una secuencia desconocida para los humanos, y así no se espera que induzca las respuestas cuando se administra a los humanos.

La región constante de inmunoglobulina de la presente invención incluye una región constante de cadena pesada. Preferiblemente, una región constante de cadena pesada que contiene una región bisagra para permitir la información del dímero IgG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 25, 21, 22 o 23. Una región constante de cadena pesada no contiene una región bisagra para permitir la formación de un monómero IgG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 27. También, una región constante de cadena pesada que contiene una región bisagra para permitir la formación de un dímero IgG2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 35. Una región constante de cadena pesada que contiene una región bisagra para permitir la formación de un dímero IgG4 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 29 o 24. Una región constante de cadena pesada que no contiene una región bisagra para permitir la formación de un monómero IgG4 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 30.

Adicionalmente, la región constante de inmunoglobulina de la presente invención incluye una región constante de cadena ligera. Preferiblemente, la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 34.

Adicionalmente, la región constante de inmunoglobulina de la presente invención incluye las regiones constantes de cadena pesada y de cadena ligera. Se prefiere un dímero o tetrámero que contiene una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 24 y una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 34.

Cuando se sobreexpresa una región de cadena pesada de inmunoglobulina en una célula procariótica tal como E. coli con el fin de ser producida en una forma aglucosilada, no se plega completamente y forma cuerpos de inclusión insolubles, inactivos mediante diversos mecanismos. Debido a que los cuerpos de inclusión no tienen actividad como proteínas, necesitan un proceso de desnaturalización adicional y de replegado, que se conjuga y consume tiempo, con el fin de ser convertido en una forma soluble que tiene actividad biológica. Así, subsiste una necesidad para el establecimiento del sistema de producción en masa útil en células procarióticas para la expresión de una región de cadena pesada de inmunoglobulina como cuerpos de inclusión.

Las proteínas E. coli transportadas al exterior del citosol tienen una secuencia de terminal N, que se divide típicamente mediante una peptidasa en el lado trans de la membrana. Mediante la secuencia denominada "secuencia de señal" o "péptido de señal", se transportan las proteínas E. coli al exterior del citosol.

El término "secuencia de señal", como se utiliza aquí, se refiere a una secuencia de aminoácidos específica que permite el transporte y la secreción de una proteína al exterior del citosol. La secuencia de señal de la presente invención es una secuencia de señal de enterotoxina II derivada de E. coli, en la presente invención, que puede ubicar el fragmento Fc en el citosol. La secuencia de señal derivada de E. coli se compone de 18 a 30 aminoácidos, y tiene diversas características comunes. La secuencia de señal típica posee un dominio de terminal N-amino muy corto de uno a varios aminoácidos positivamente cargados, seguido por una región hidrófoba relativamente larga, dominio H. En el extremo de terminal amino, están presentes muchos aminoácidos polares cargados positivamente, tales como Lys y Arg. El dominio H contiene principalmente residuos hidrófobos tales como Ala y Leu. Un dominio C se ubica entre el dominio H y una proteína que prácticamente se secreta, y tiene una secuencia reconocida por una peptidasa de señal. Una proteína que tiene tal secuencia de señal de manera general llega a la membrana mediante

interacción con diversas proteínas y luego se divide en un sitio específico mediante una peptidasa de señal, que libera la proteína madura. La secuencia de señal de la presente invención incluye derivados que resultan de una eliminación, una inserción, una sustitución conservadora o no conservadora o combinaciones de los mismos, mientras que una proteína expresada a lo largo de la secuencia de señal le permite ser procesada exactamente y presentada en el citosol. En particular, pueden ser deseables los derivados que mejoran la eficacia de expresión de una proteína de fusión en el citosol.

La enterotoxina II estable al calor incluye su forma nativa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 36 así como también derivados de los mismos. Se reporta previamente que un derivado de la secuencia de señal de enterotoxina II estable al calor E. coli mejora la eficiencia de secreción de diversas proteínas heterogéneas en E. coli (Registro de Patente Coreana No. 0316347). Un derivado enterotoxina II tiene preferiblemente un reemplazo de una secuencia de aminoácidos de uno o más residuos de aminoácido en las posiciones 2, 4, 5, 12, 20 y 22 mediante otra secuencia de aminoácidos, y más preferiblemente mediante la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 o 46. En la práctica detallada de la presente invención, se utiliza una enterotoxina II que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 38, que se codifica por la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO. 12.

Un ácido nucleico que codifica la enterotoxina II natural se puede aislar en forma natural o sintetizar mediante un método de síntesis génica. Se puede preparar un derivado de enterotoxina II al realizar mutagenia dirigida a sitio para una forma natural aislada de manera natural, o se puede sintetizar mediante un método de síntesis génica.

El término "proteína de fusión", como se utiliza aquí, significa dos o más polipéptidos diferentes que se ligan a través de un enlace de péptido que llega a ser un polipéptido de cadena sencilla, y se puede preparar fácilmente mediante un método de recombinación genético que permite la traducción en un polipéptido único. Con los objetos de la presente invención, la proteína de fusión se refiere a formar una región constante de inmunoglobulina fusionada a una secuencia de señal de enterotoxina II estable al calor E. coli. La secuencia de señal y la región constante de inmunoglobulina están en un marco y se traducen en una cadena sencilla bajo el control de un único promotor, pero la secuencia de señal se retira finalmente mediante la división del polipéptido traducido. No se limita específicamente un método para preparar la proteína de fusión. Preferiblemente, con base en tecnologías de ADN recombinante, la proteína de fusión se prepara al digerir una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señal y otra secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de inmunoglobulina con enzimas de restricción generales y ligarlas con las demás utilizando una enzima tal como ligasa.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión se expresa en la forma en que inserta dentro un vector de expresión recombinante.

El término "vector de expresión recombinante", como se utiliza aquí, que describe un vector capaz de expresar una proteína objetivo en una célula anfitriona adecuada, se refiere a una construcción genética que comprende elementos reguladores esenciales a los que un inserto de gen se liga en forma operable de tal manera que se expresa en una célula anfitriona.

El término "ligado en forma operable", como se utiliza aquí, se refiere a un ligado funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína objetivo en tal forma que permite las funciones generales. Se puede preparar el ligado operable a un vector recombinante utilizando una técnica recombinante genética bien conocida en la técnica, y se pueden llevar a cabo la unión y división de ADN específica de sitio utilizando enzimas de manera general conocidas en la técnica.

Un vector de expresión adecuado incluye elementos reguladores de expresión, tales como un promotor, un codón de inicio, un codón de parada, una señal de poliadenilación y un mejorador. Si se utiliza E. coli como un anfitrión, se pueden utilizar los siguientes promotores: promotor trp, promotor lac, promotor recA, promotor λPL, promotor lpp y promotor T7. Si un anfitrión pertenece a Bacillus sp., se pueden utilizar los siguientes promotores: promotor SPO1, promotor SPO2 y promotor penP. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Los codones de parada y de inicio son necesarios por ser funcionales en un individuo a quien se ha administrado una construcción genética, y puede estar en marco con la secuencia codificante. El promotor del vector puede ser constitutivo o inducible. Adicionalmente, los vectores de expresión incluyen un marcador seleccionable que permite la selección de células anfitrionas que contienen el vector, y los vectores de expresión replicables incluyen un origen de replicación.

El vector de expresión de la presente invención es un vector que contiene una secuencia de señal de enterotoxina II E. coli estable al calor. Es más preferible un vector, que incluye una secuencia de enterotoxina II Shine-Dalgarno (SD) junto con una secuencia de señal de enterotoxina II, debido a que este mejora adicionalmente los niveles de expresión de una proteína objetivo. En la presente invención, para expresar una proteína de fusión de región de cadena pesada de inmunoglobulina de secuencia de señal enterotoxina II, una secuencia de nucleótido que codifica

una secuencia de enterotoxina II Shine-Dalgarno (SD) y una secuencia de señal de enterotoxina II se liga a otra secuencia de nucleótido que codifica una región de cadena pesada de inmunoglobulina mediante un método de recombinación genético en tal forma que se expresa en el marco bajo el control de un promotor.

En la práctica detallada de la presente invención, se preparan los siguientes vectores de expresión recombinante: pSTIIG1CH1_3 que expresa una región de cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 25; pSTIIdCG1Fc que expresa una región de cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 21; pSTIIdCG1SFc que expresa una región de cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 22; pSTIIdCG1SFFc que expresa una región de cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 23; pSTIIG1Mo que expresa una región de cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 27; pSTIIdCG2Fc que expresa una región de cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 35; pSTIIdCG4Fc que expresa una región de cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 29; pSTIIG4CH1_3 que expresa una región de cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 24; y pSTIIG4Mo que expresa una región de cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 30.

En la práctica detallada de la presente invención, un vector de expresión recombinante, pSTIIG4H_K, expresa una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 24, y una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina que incluye una secuencia de señal de enterotoxina II y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 34, bajo el control de los promotores independientes.

Los vectores de expresión recombinante que expresan las proteínas de fusión se transforman en células anfitrionas.

Con respecto a los objetos de la presente invención, las células anfitrionas son células procarióticas en donde no ocurre glucosilación. Ejemplos de estas células procarióticas incluyen Escherichia coli, Bacillus subtilis, Streptomyces, Pseudomonas, Proteus mirabilis o Staphylococcus. Se prefiere E. coli. Ejemplos no limitantes de las cepas E. coli incluyen BL21 (DE3), JM109, DH series, TOP10 y HB101, y es más preferible la cepa BL21 (DE3). Cuando se utiliza E. coli como una célula anfitriona, debido a que E. coli no tiene un sistema para la glucosilación de la proteína, se produce una región constante de inmunoglobulina en la forma que se evita de las unidades estructurales de azúcar que están presentes en un dominio CH2 de una inmunoglobulina natural. Las unidades estructurales de azúcar del dominio de inmunoglobulina CH2 no afectan la estabilidad estructural de las inmunoglobulinas, pero provoca que las inmunoglobulinas medien la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) luego de la asociación con células que expresan los receptores Fc y las células inmunes secretan citoquinas para inducir inflamación. También, las unidades estructurales de azúcar se unen a la parte C1q del primer componente C1 de complemento, que conduce a fijación de complemento. Así, cuando se produce una región constante de inmunoglobulina en una forma aglucosilada y se liga a una proteína terapéutica, la proteína terapéutica está presente en el suero durante un periodo prolongado de tiempo sin las funciones efectoras indeseables de las inmunoglobulinas.

La transformación de los vectores de expresión recombinante en las células procarióticas incluye cualesquier métodos mediante los que se introducen ácidos nucleicos dentro de las células, y, como se conoce en la técnica, se pueden desarrollar al seleccionar técnicas estándar adecuadas de acuerdo con las células anfitrionas. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, electroporación, fusión de protoplasto, precipitación por fosfato de calcio ($CaPO_4$), precipitación por cloruro de calcio ($CaCl_2$), agitación con fibra de carburo de silicona, y PEG-, sulfato de dextrano y transformación mediada por lipofectamina.

En la práctica detallada de la presente invención, los vectores de expresión recombinante se introducen individualmente en E. coli, generando así los siguientes transformantes: BL21/pSTIIG1CH1_3(HM10935) transformado con pSTIIG1CH1_3; BL21/pSTIIdCG1Fc (HM10927) transformado con pSTIIdCG1Fc; BL21/pSTIIdCG1SFc (HM10928) transformado con pSTIIdCG1SFc; BL21/pSTIIdCG1SFFc (HM10929) transformado con pSTIIdCG1SFFc; BL21/pSTIIG1Mo (HM10930) transformado con pSTIIG1Mo; BL21/pSTIIdCG2Fc (HM10936) transformado con pSTIIdCG2Fc; BL21/pSTIIdCG4Fc(HM10932) transformado con pSTIIdCG4Fc; BL21/pSTIIG4CH1_3(HM10931) transformado con pSTIIG4CH1_3; BL21/pSTIIG4Mo(HM10933) transformado con pSTIIG4Mo; y BL21/pSTIIG4H_K (HM10934) transformado con pSTIIG4H_K.

Los transformantes transformados con el vector de expresión recombinante se cultivan mediante un método general. Las condiciones de cultivo se pueden ajustar fácilmente por parte de aquellos expertos en la técnica que son adecuadas para las cepas bacterianas seleccionadas. Típicamente, un medio utilizado en el cultivo debe contener

todos los nutrientes esenciales para el crecimiento y la supervivencia de las células. El medio debe contener una variedad de fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y oligoelementos. Ejemplos de fuentes de carbono disponibles incluyen glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, carbohidratos tales como celulosa, grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco, ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Se pueden utilizar estas fuentes de carbono solos o en combinación de dos o más. Ejemplos de fuentes de nitrógeno disponibles incluyen fuentes de nitrógeno orgánicas, tales como peptona, extracto de lavadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz (CSL) y suero de leche de soja, y fuentes de nitrógeno inorgánicas, tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden utilizar solas o en combinaciones de dos o más. El medio puede contener una fuente de fósforo, que incluye dihidrogen fosfato de potasio, hidrogen fosfato de dipotasio y sales que contienen sodio correspondientes. Adicionalmente, el medio puede contener una sal de metal, tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. El medio puede incluir adicionalmente aminoácidos, vitaminas, precursores adecuados, y similares. El pH del cultivo se puede ajustar al agregar un compuesto, tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico, al cultivo mediante un método adecuado. También, se pueden utilizar durante el cultivo, los agentes antiespumantes, tales como ésteres de ácido graso poliglicol, para evitar la formación de burbujas. Para mantener el cultivo en estados favorables, se introduce oxígeno o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) dentro del cultivo. La temperatura del cultivo es de manera general de 20° C a 45° C, y preferiblemente de 25° C a 45° C.

Después que se confirma la expresión de la proteína en un volumen pequeño del medio, se puede llevar a cabo expresión a gran escala utilizando un fermentador. La producción de proteína utilizando un fermentador se puede llevar a cabo tomando en consideración diversos factores, que incluyen el índice de crecimiento de las células anfitrionas y los niveles de expresión de proteínas.

Se puede inducir la expresión de la proteína al agregar, por ejemplo, IPTG al medio bajo condiciones de cultivo adecuadas.

La región constante de inmunoglobulina fusionada a una secuencia de señal de acuerdo con la presente invención, expresada en una célula procariótica de acuerdo con el método anterior, no se expresa sorprendentemente en el espacio periplásmico pero se sobreexpresa en una forma soluble en agua en el citoplasma, y se procesa con precisión la secuencia de señal. En la práctica detallada de la presente invención, la cantidad de la proteína de fusión secretada en el medio o espacio periplásmico es insignificante. Cuando las células se interrumpen y se someten a Western blot, las proteínas se sobreexpresan en el citoplasma en una forma soluble en agua. También, el análisis de aminoácido de la región de terminal N de una región de cadena pesada de inmunoglobulina expresada en el citoplasma revela que se procesa con precisión una secuencia de señal.

Esta estrategia de expresión de proteína es mucho más efectiva que los métodos convencionales con base en las proteínas activas aisladas de cuerpos de inclusión así como también otros métodos convencionales con base en las proteínas objetivos secretadas en el espacio periplásmico o medio a través de fusión con diversas secuencias de señal. Esto se debe a los métodos convencionales que tienen las siguientes desventajas principales. Primero, la proteína lipasa agregada mediante sobrexpresión debe experimentar un proceso complejo adicional que incluye disolución y desnaturalización en una solución adecuada y replegado utilizando un agente de replegado tal como una urea, guanidina o arginina (Kohno, Meth. Enzym. 185:187-195, 1990). A pesar de este proceso complejo, la eficacia de replegado de la proteína es muy baja, y las proteínas replegadas tienen menor actividad que las proteínas solubles. Así, este método de replegado no tiene beneficios industriales. Segundo, existen grandes diferencias entre las proteínas que se van a expresar como formas recombinantes en el grado de secreción dentro del espacio periplásmico o medio, grado de agregación después de secreción, eficiencia de expresión; y similares. Como se sabe previamente, las eficiencias de expresión son muy bajas con relación a las proteínas expresadas en formas solubles en el citoplasma. También, pueden estar presentes las proteínas como cuerpos de inclusión aún cuando se secretan dentro del espacio periplásmico.

Así, el método actual proporciona un sistema novedoso útil para producción industrial en masa de la región constante de inmunoglobulina.

Una región constante de inmunoglobulina que se sobreexpresa de acuerdo con el método actual se puede purificar mediante una técnica general. Las regiones constantes de inmunoglobulina de la presente invención, producidas por los transformantes, se pueden aislar y purificar al interrumpir las células utilizando una prensa Francesa, un ultrasonicador, etc., y someter una fracción soluble en agua que contiene la región constante de inmunoglobulina a, por ejemplo, desalinización (por ejemplo, precipitación de sulfato de amonio, precipitación de fosfato de sodio, etc.), precipitación de solvente (por ejemplo, precipitación de fracción de proteína utilizando acetona, etanol, etc.), diálisis, diversas cromatografías, tales como filtración de gel, intercambio iónico y cromatografía de columna de fase inversa, y ultrafiltración. Estas técnicas se utilizan solas o en combinación de dos o más para obtener una proteína que codifica la región constante de inmunoglobulina de la presente invención (Maniatis et al., Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA (1990)).

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una región constante de inmunoglobulina preparada de acuerdo con el método anterior.

La región constante de inmunoglobulina producida en las células procarióticas tales como E. coli de acuerdo con el método actual no ha limitado específicamente las aplicaciones industriales. Se utiliza una aplicación de ejemplo como un portador para la formación de un conjugado con un cierto fármaco. La construcción del conjugado que comprende la región constante de inmunoglobulina ligada a un fármaco no se limita específicamente. Por ejemplo, la región constante de inmunoglobulina y el fármaco se pueden ligar en diversas relaciones, y el ligado se puede mediar, por ejemplo, a través de un ligador.

El fármaco incluye polipéptidos, compuestos, extractos y ácidos nucleicos. Se prefiere un fármaco de polipéptido (utilizado con significado idéntico a la palabra "proteína"). El ligador incluye péptido y ligadores no péptido. Se prefiere un ligador no péptido, y es más preferido un polímero no péptido. Un ejemplo preferido de la cadena pesada de inmunoglobulina es Fc.

Si la vida útil del suero necesita ser mejorada, se puede utilizar cualquier polipéptido fisiológicamente activo sin limitación específica como un socio de proteína de la región constante de inmunoglobulina preparada de acuerdo con el método actual para formar un conjugado. Tales polipéptidos fisiológicamente activos incluyen aquellos utilizados para tratar o evitar enfermedades humanas, que incluyen citoquinas, interleuquinas, proteína de unión a interleuquina, enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, factores reguladores de transcripción, factores de coagulación, vacunas, proteínas estructurales, proteínas o receptores de ligando, antígenos de superficie celular, antagonistas del receptor, y derivados y análogos de los mismos.

En detalle, ejemplos no limitantes del polipéptido fisiológicamente activo incluye la hormona de crecimiento humana, hormona de liberación de hormona de crecimiento, péptido de liberación de hormona de crecimiento, interferones y receptores de interferón (por ejemplo, interferón- α, -β y -γ, receptor de interferón tipo I soluble en agua, etc.), factores estimuladores de colonia, interleuquinas (por ejemplo, interleuquina- 1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17,-18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, etc.) y receptores de interleuquina (por ejemplo, receptor IL-1, receptor IL-4, etc.), enzimas (por ejemplo, glucocerebrosidasa, iduronato-2-sulfatasa, alfa-galactosidasa-A, agalsidasa alfa y beta, alfa-L-iduronidasa, butirilcolinesterasa, chitinasa, glutamato descarboxilasa, imiglucerasa, lipasa, uricasa, factor acetilhidrolasa activante de plaqueta, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a citoquina e interleuquina (por ejemplo, IL-18bp, proteína de unión TNF, etc.), factor activante de macrófago, péptido de macrófago, factor de célula B, factor de célula T, proteína A, inhibidor de alergia, glucoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfotoxina, factor de necrosis de tumor, supresores de tumor, factor de crecimiento de metástasis, antitripsina alfa-1, albúmina, alfa-lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glucosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activante del receptor trombina, trombomodulina, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor XIII, factor activante de plasminógeno, péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor renina, inhibidor de colagenasa, dismutasa superóxido, leptina, factor de crecimiento derivado de plaqueta, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína de estimulación ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor que induce cartílago, elcatonina, factor activante de tejido conjuntivo, inhibidor de la ruta de factor de tejido, hormona estimulante de folículo, hormona luteinizante, hormona de liberación de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor-1 de axogenia, péptido natriurético de cerebro, factor neurotrófico derivado de células gliales, netrina, factor inhibidor de neutrófilo, factor neurotrófico, neuturina, etc.), hormona paratiroide, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a insulina, hormona adrenocortical, glucagon, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido de liberación de gastrina, factor de liberación de corticotropina, hormona que estimula la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores (por ejemplo, TNFR(P75), TNFR(P55), receptor IL-1, receptor VEGF, receptor del factor activante de célula B, etc.), antagonistas del receptor (por ejemplo, IL1-Ra etc.), antígenos de superficie celular (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', F(ab')2 y Fd), y antígenos de vacuna derivados de virus. El polipéptido fisiológicamente activo útil en la presente invención puede estar de forma natural, se puede producir por recombinación genética utilizando células procarióticas tales E. coli o células eucarióticas tales como células de levadura, células de insecto y células de animal, o puede ser un derivado que tiene uno o más mutaciones de aminoácido pero que tiene actividad biológica idéntica a la forma natural.

En una realización preferida de la presente invención, un fragmento de región constante de inmunoglobulina producido por el transformante BL21/pSTIIdCG1SFFc (HM10929) se liga a eritropoyetina humana (EPO) utilizando un polímero soluble en agua, polietilenglicol, proporcionando así un conjugado de proteína de la región constante de

inmunoglobulina EPO-PEG. Se encuentra que este conjugado de proteína exhibe una vida útil del suero extendida comparado con el EPO natural y la segunda generación de EPO tiene vida útil del suero mejorada, Aranesp (Amgen). Así, la región constante de inmunoglobulina producida en una forma soluble en agua utilizando una secuencia de señal E. coli de acuerdo con la presente invención, en la forma que se liga a un polipéptido fisiológicamente activo, puede ser útil para mejorar la vida útil del suero y la actividad fisiológica del polipéptido fisiológicamente activo sin riesgo de inducir respuestas inmunes.

Se puede obtener un mejor entendimiento de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se establecen para ilustrar, pero no se constituyen como limitantes de la presente invención.

EJEMPLO 1: Construcción del vector de expresión de la región constante Fc IgG1 de inmunoglobulina humana

<1-1> Construcción del vector de expresión de la región constante IgG1 dimérica

Para clonar las regiones constantes de cadena ligera y de cadena pesada que incluyen el dominio CH1 y la región bisagra de IgG1, se lleva a cabo RT-PCR utilizando ARN aislado de glóbulos rojos humanos como una plantilla, como sigue. Primero, se aísla el ARN total de aproximadamente 6 ml de sangre utilizando un equipo de ARN en sangre Qiamp (Qiagen), y se realiza amplificación de gen utilizando el ARN total como una plantilla y un equipo RT-PCR de una etapa (Qiagen). Para amplificar un gen de cadena pesada, se utiliza un par de cebadores representados por la SEQ ID Nos. 1 y 2, y para amplificar un gen que codifica la región constante de una cadena ligera kappa, se utiliza otro par de cebadores representados por la SEQ ID Nos. 3 y 4. Para facilitar clonación de gen, un sitio de reconocimiento HindIII se introduce en cebadores 5' de la SEQ ID Nos. 1 y 3, y un sitio de reconocimiento BamHI que contiene un codón de parada en los cebadores 3' de la SEQ ID Nos. 2 y 4. Los productos de la región constante de cadena ligera y de cadena pesada amplificada se digieren con HindIII y BamHI, respectivamente, y se insertan en un plásmido pBluscript SK (-) (Stratagen) tratado con la misma enzima de restricción, dando así pBG1CH1-3, y pBK, respectivamente. El análisis de secuencia de ADN revela que los dos genes clonados en el vector de clonación, el gen IgG1 CH1-bisagra-CH2-CH3 de cadena pesada y el gen de región constante de cadena ligera, tienen las secuencias de nucleótido de la SEQ ID Nos. 5 y 6, respectivamente.

Para construir los vectores que expresan las regiones constantes IgG1, el PCR se lleva a cabo utilizando el plásmido como se preparó anteriormente como una plantilla para amplificar genes que codifican los siguientes fragmentos de región constante. Un par de cebadores representados por las SEQ ID Nos. 7 y 2 se designan para amplificar el CH1, región bisagra, CH2 y CH3 de IgG1. Un fragmento Fc que carece de residuos cisteína no participa en la formación de enlace de disulfuro en la región bisagra que se amplifica utilizando tres pares de cebador de la SEQ ID Nos. 8 y 2, 9 y 2, y 10 y 2. Un gen amplificado utilizando un primer par de la SEQ ID Nos. 7 y 2 y el plásmido pBGICH1-3 como una plantilla contenida en el CH1-bisagra-CH2-CH3 de IgG1 y codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No. 25. La SEQ ID No. 8 es una secuencia de nucleótido que parte del residuo 13, prolina, de 15 residuos de aminoácido de la región bisagra (Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro; SEQ ID No. 26). Un gen amplificado utilizando un primer par de la SEQ ID Nos. 8 y 2 y el plásmido pBG1CH1-3 como una plantilla codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 21) que codifica un extremo de terminal amino partiendo de la secuencia Pro-Cys-Pro de la región bisagra y los dominios CH2 y CH3, entre la región constante IgG1 completa. Se prepara la SEQ ID No. 9 al reemplazar el residuo 13 prolina de la región bisagra con serina, y se prepara la SEQ ID No. 10 al reemplazar el residuo 13 de prolina de la región bisagra con serina y el residuo 4 de leucina del CH2 con fenilalanina. Así, los genes amplificados utilizando los dos primeros pares de la SEQ ID Nos. 9 y 2; y 10 y 2 y el plásmido pBG1CH1-3 como una plantilla pueden expresar las proteínas diméricas (SEQ ID Nos. 22 y 23) a través de enlaces disulfuro entre los residuos cisteina de la región bisagra en las células anfitrionas.

Para clonar los fragmentos de la región constante IgG1 amplificada dentro de un vector de expresión que contiene una secuencia de señal de enterotoxina II estable al calor E. coli, un vector de expresión pT14S1SH-4T20V22Q (Patente Coreana No. 38061), previamente desarrollada por los actuales inventores, se utiliza como un vector de partida. Este vector de expresión contiene un derivado de la secuencia de señal de enterotoxina estable al calor E. coli que tiene la secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID No. 12. Para facilitar la clonación, se inserta un sitio de reconocimiento StuI en un extremo del derivado de la secuencia de señal de enterotoxina estable al calor E. coli del plásmido pT14S1SH-4T20V22Q a través de mutagenia dirigida a sitio utilizando un par de cebadores representados por la SEQ ID Nos. 13 y 14 para inducir mutagenia para introducir el sitio StuI en una secuencia de nucleótido que codifica el último residuo de aminoácido de la secuencia de señal. Esta inserción del sitio StuI se identifica por ser exitosa mediante el secuenciamiento de ADN. El plásmido pT14S1SH-4T20V22Q resultante que contiene un sitio StuI se designa como "pmSTII". El plásmido pmSTII se trata con StuI y BamHI y se somete a electrofóresis en gel de agarosa, y se purifica un fragmento grande (4.7 kb), que contiene el derivado de la secuencia de señal de enterotoxina estable al calor E. coli. Luego, los genes amplificados se digieren con BamHI y se ligan con el vector de expresión linearizado, proporcionando así pSTIIG1CH1_3 (producto PCR obtenido utilizando los cebadores de la SEQ ID Nos. 7 y 2), y pSTIIdCG1Fc (producto PCR, obtenido utilizando los cebadores

de la SEQ ID Nos. 8 y 2), pSTIIdCG1SFc (producto PCR obtenido utilizando los cebadores de la SEQ ID Nos. 9 y 2), y pSTIIdCG1SFFc (producto PCR obtenido utilizando los cebadores de la SEQ ID Nos. 10 y 2). Los vectores de expresión finales se transforman en E. coli BL21 (DE3), y los transformantes resultantes se designan como "BL21/pSTIIG1CH1_3 (HM10935)", "BL21/pSTIIdCG1Fc (HM10927)", "BL21/pSTIIdCG1SFc (HM10928)" y "BL21/pSTIIdCG1SFFc (HM10929)". Los transformantes se depositan en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (KCCM; Yurim B/D, Honje 1-dong, Sudaemum-gu, Seoul, República de Corea) en Sep. 15, 2004 y números de acceso asignados KCCM- 10600, KCCM-10588, KCCM-10589 y KCCM-10594.

<1-2> Construcción del vector de expresión de la región constante IgG1 monomérica

Para clonar una región constante IgG1 que se va a expresar en una forma monomérica, se lleva a cabo el PCR utilizando un par de cebadores representados por la SEQ ID Nos. 11 y 2 y la misma plantilla como se hizo anteriormente <1-1>.

El producto PCR se clona dentro de un vector de expresión, pmSTII, de acuerdo con el mismo procedimiento como se hizo anteriormente <1-1>, proporcionando así pSTIIG1Mo (producto PCR obtenido utilizando los cebadores de la SEQ ID NOS. 11 y 2). Este vector de expresión se transforma en E. coli BL21 (DE3), y el transformante resultante se designa como "BL21/pSTIIG1Mo (HM10930)", que se deposita en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (KCCM) en Sep. 15, 2004 y número de acceso asignado KCCM-10595. Una proteína expresada por el vector de expresión se expresa del dominio CH2 y se presenta en una forma monomérica debido a que este carece de la región bisagra, y que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 27.

EJEMPLO 2: Construcción del vector de expresión Fc IgG2 de inmunoglobulina humana

Para clonar un gen Fc IgG2, se lleva a cabo RT-PCR de acuerdo con el mismo método como en el <1-1> del Ejemplo 1 utilizando ARN aislado de glóbulos rojos humanos como una plantilla y un equipo RT-PCR de una etapa (Qiagen). Para obtener una secuencia de gen deseada, se utiliza un par de cebadores representados por la SEQ ID Nos. 31 y 32. La SEQ ID No. 31 es una secuencia de nucleótido que parte del residuo 10, prolina, de 12 residuos de aminoácido de la región bisagra (Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro; SEQ ID NO. 33). El gen amplificado que utiliza el par de cebadores representados por la SEQ ID Nos. 31 y 32 se identifica por contener un extremo de terminal amino partiendo de la secuencia Pro-Cys-Pro de la región bisagra y los dominios CH2 y CH3, entre una secuencia de gen Fc IgG2 de longitud completa, y tiene la secuencia de nucleótido de la SEQ ID No. 35. Para clonar el gen Fc IgG2 amplificado dentro de un vector de expresión que contiene una secuencia de señal de enterotoxina II estable al calor E. coli, se utiliza el vector pmSTII mencionado anteriormente. De acuerdo con un procedimiento de clonación similar a aquel en el <1-1> del Ejemplo 1, el plásmido pmSTII se trata con StuI y BamHI y se somete a electroforesis en gel de agarosa, y se purifica un fragmento grande (4.7 kb), que contiene el derivado de la secuencia de señal de enterotoxina estable al calor E. coli. Luego, el gen Fc IgG2 amplificado se digiere con BamHI y se liga con el vector de expresión linearizado, proporcionando así pSTIIdCG2Fc. Este vector expresa en una célula anfitriona una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 35 y está presente en una forma dimérica mediante enlaces disulfuro entre los residuos cisteína en la región bisagra. El vector de expresión final se transforma en E. coli BL21 (DE3), y el transformante resultante se designa como "BL21/pSTIIdCG2Fc (HM10936)".

EJEMPLO 3: Construcción del vector de expresión de la región constante IgG4 de inmunoglobulina humana

<3-1> Construcción del vector de expresión de la región constante IgG4 dimérica

Para clonar una región constante de cadena pesada de IgG4 de inmunoglobulina humana, la mutagenia dirigida a sitio se lleva a cabo utilizando el plásmido pBG1CH1_3 del <1-1> del Ejemplo 1, que contiene una región constante de cadena pesada IgG1, como una plantilla, proporcionando así un plásmido pBG4CH1_3 que lleva un gen que codifica el CH1-Bisagra-CH2-CH3 de IgG4. El análisis de secuencia de ADN revela que la secuencia de ADN mutada contiene una sustitución de una región constante IgG4 para la región constante IgG1 y tiene la secuencia de nucleótido de la SEQ ID No. 15. El PCR se lleva a cabo de acuerdo con el mismo método como en el Ejemplo 1 excepto para el uso de diferentes cebadores y el plásmido pBG4CH1_3 como una plantilla. Este PCR se lleva a cabo para retirar residuos cisteína que no participan en la formación de enlace de disulfuro del extremo 5' de una región constante IgG4, utilizando el plásmido pBG4CH1-3 como una plantilla y un par de cebadores representados por la SEQ ID Nos. 16 y 17. La SEQ ID No. 16 es una secuencia de nucleótido que parte del residuo 10, serina, de 12 residuos de aminoácido de la región bisagra IgG4 (Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro: SEQ ID No. 28). La SEQ ID No. 17 tiene un sitio de reconocimiento BamHI que contiene un codón de parada. Un gen amplificado utilizando el par de cebador anterior codificado por un extremo de terminal amino que parte de la secuencia de residuo Ser-Cys-Pro de la región bisagra y los dominios CH2 y CH3, entre la región constante IgG4 completa. El gen amplificado se trata con BamHI y se inserta en un plásmido pmSTII que digiere StuI/BamHI, proporcionando así pSTIIG4Fc. Una proteína expresada por este vector de expresión tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 29 y está presente en una forma dimérica a través de enlaces disulfuro entre los

residuos cisteína de la región bisagra. También, para construir un vector de expresión para una región constante (CH1-Bisagra-CH2-CH3) que contiene un dominio CH1, el PCR se lleva a cabo utilizando el pBG4CH1-3 como una plantilla y un par de cebadores representados por la SEQ ID Nos. 19 y 17, y el producto PCR se clona de acuerdo con el mismo método como se describió anteriormente, proporcionando así pSTIIG4CH1_3. Una proteína expresada por este vector de expresión tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 24.

Adicionalmente, un vector que expresa las regiones constantes de cadena ligera y de cadena pesada de una inmunoglobulina se construye como sigue. Primero, un gen deseado se amplifica utilizando el plásmido pBK preparado en el <1-1> del Ejemplo 1 como una plantilla y un conjunto de cebadores representados por la SEQ ID Nos. 20 y 4, y se clona en un derivado de vector pmSTII que contiene una secuencia de señal de enterotoxina II E. coli estable al calor, generando así un plásmido pSTIIK. El plásmido pSTIIK incluye un fragmento de gen que comprende una región constante kappa de cadena ligera ligada a un derivado de secuencia de señal de enterotoxina II E. coli estable al calor. El plásmido pSTIIK se digiere con HindIII y SalI para obtener un fragmento de gen de aproximadamente 1.2-kb que contiene las secuencias requeridas para la expresión de proteína, que incluye un promotor y una secuencia de señal. El fragmento de gen 1.2- kb se inserta en un sitio NruI del vector pSTIIG4CH1_3, proporcionando así un vector pSTIIG4H_K. Este vector de expresión expresa una región constante de cadena pesada y una región constante de cadena ligera bajo el control de diferentes promotores, y los productos expresados forman un dímero o tetrámero ligado a través de residuos cisteína libres en cada cadena. Los vectores de expresión anteriores se transforman individualmente en E. coli BL21 (DE3), y los transformantes resultantes se designan como "BL21/pSTIIG4CH1_3(HM10931)", "BL21/pSTIIdCG4Fc (HM10932)" y "BL21/pSTIIG4H_K (HM10934)", y se depositan en KCCM (números de acceso: KCCM-10596, KCCM-10597 y KCCM-10599).

<3-2> Construcción del vector de expresión de región constante IgG4 monomérica

Para clonar una región constante IgG4 que se va a expresar como un monómero, se amplifica un gen IgG4 CH2-3 utilizando un par de cebadores de la SEQ ID Nos. 18 y 17 de acuerdo con el mismo método como en el <3-1> del Ejemplo 3, y se clona dentro de un vector de expresión, pmSTII, proporcionando así un plásmido pSTIIG4Mo. Este vector de expresión se transforma en E. coli BL21 (DE3), y el transformante resultante se designa como "BL21/pSTIIG4Mo (HM10933)", que se deposita en KCCM en Sep. 21, 2004 y número de acceso asignado KCCM-10598. Una proteína expresada mediante el vector de expresión que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 30, se expresa del dominio CH2, y está presente en una forma monomérica debido a que este carece de la región bisagra.

El vector de expresión recombinante, capaz de expresar una región constante de inmunoglobulina en una forma soluble en agua en E. coli utilizando un derivado de la secuencia de señal de enterotoxina II E. coli estable al calor, y microorganismos transformados con el vector de expresión se resumen en la Tabla 1, adelante.

TABLA 1

Vectores de expresión	Transformantes	Constitución de proteínas expresadas
pSTIIdCG1Fc	BL21/pSTIIdCG1Fc (HM10927)	G1 Fc (12 eliminaciones de aminoácido en la región bisagra de la SEQ ID No. 26)
pSTIIdCG1SFc	BL21/pSTIIdCG1SFc (HM10928)	G1 Fc (12 eliminaciones de aminoácido en la región bisagra de la SEQ ID No. 26 y una sustitución de Ser para el primer residuo)
pSTIIdCG1SFFc	BL21/pSTIIdCG1SFFc (HM10929)	G1 Fc (12 eliminaciones de aminoácido en la región bisagra de la SEQ ID No. 26 y una sustitución de Phe para el residuo 234 Ser)
pSTIIG1Mo	BL21/pSTIIG1Mo (HM10930)	G1 Fc (15 eliminaciones de aminoácido en la región bisagra de la SEQ ID No. 26)
pSTIIdCG2Pc	BL21/pSTIIdCG2Fc (HM10936)	G2 Fc (9 eliminaciones de aminoácido en la región bisagra de la SEQ ID No. 33)
pSTIIG4CH1 3	BL21/pSTIIG4CH1 3 (HM10931)	G4 CH1-bisagra-CH2-CH3
pSTIIdCG4Fc	BL21/psTIIdcG4Fc (HM10932)	G4 Fc (9 eliminaciones de aminoácido en la región bisagra de la SEQ ID No. 28)
pSTIIG4Mo	BL21/pSTIIG4Mo (HM10933)	G4 Fc (12 eliminaciones de aminoácido en la región bisagra de la SEQ ID No. 28)

(continuación)

Vectores de expresión	Transformantes	Constitución de proteínas expresadas
pSTIIG4H	K BL21/pSTIIG4H K (HM10934)	G4 CH1-bisagra (SEQ ID No. 28)-CH2-CH3 y región constante de cadena ligera
pSTIIG1CH1 3	BL21/pSTIIG1CH1 3 (HM10935)	G1 CH1-bisagra (SED ID No. 26)-CH2-CH3

EJEMPLO 4: Expresión y purificación de la región constante de inmunoglobulina

<4-1> Expresión y purificación

Los transformantes bacterianos preparados en los Ejemplos 1, 2 se inoculan individualmente en un fermentador (Marubishi Company) y se dejan fermentar, y se evalúan para determinar si expresan los fragmentos de la región constante de inmunoglobulina.

Primero, cada transformante se hace crecer en 100 ml de medio LB con agitación durante la noche y se inocula en el fermentador para cultivo a gran escala. El fermentador se mantiene de 30° C o 35° C. Para evitar la conversión de un ambiente aeróbico a uno anaeróbico, los cultivos se airean con 20-vvm aire y se agitan a 500 rpm. Para compensar los nutrientes insuficientes para crecimiento bacteriano durante fermentación, los cultivos se complementan con glucosa y extractos de levadura de acuerdo con los estados fermentados de bacterias. Cuando los cultivos alcanzan un valor OD_{600} de 80, se agrega un inductor, IPTG, a los cultivos para inducir expresión de la proteína. Los cultivos se cultivan adicionalmente durante 40 a 45 hrs hasta que el valor OD a 600 nm aumenta de 100 a 120.

Se examina la expresión de la inmunoglobulina Fc en los transformantes E. coli y los sitios expresados, solubilidad en agua y formación de dímero del Fc Ig expresado como sigue. Para determinar si se secreta un producto expresado en el fluido de fermentación o el espacio periplásmico de E. coli mediante la secuencia de señal fusionada al vector de expresión, se centrifuga el fluido de fermentación para obtener un fluido de fermentación libre de células y células recolectadas. El fluido de fermentación libre de células y una solución de espacio periplásmico obtenida mediante choque osmótico de las células recolectadas se somete a análisis Western blot. Como resultado, se detecta una cantidad muy pequeña de Fc de inmunoglobulina. Para investigar la expresión intracelular de Fc Ig, las células se interrumpen utilizando un ultrasonicador (Misonix Company). El lisato celular resultante se centrifuga para separar sustancias solubles en agua de sustancias insolubles en agua, y las sustancias solubles en agua se someten a análisis Western blot, como sigue. Se mezclan las sustancias solubles en agua con un regulador de muestra de proteína que no contiene un agente de reducción tal como DTT o β-mercaptoetanol, y se separa 15% de gel SDS-PAGE (Criterion Gel, Bio-Rad). Luego, se transfieren las proteínas en una membrana de nitrocelulosa y se detecta con un anticuerpo Fc antihumano conjugado con HRP (Sigma). Como se muestra en la FIGURA 1, el Fc de inmunoglobulina se sobreexpresa en una forma soluble en agua y se ubica en el citosol de E. coli. También, los productos, expresados mediante los transformantes transformados con los vectores de expresión que expresan Fc Ig tienen una porción de una región bisagra, se expresan como dímeros. En la FIGURA 1, líneas 1, 2 y 3 muestran los productos expresados en HM10927, HM10932 y HM10936, respectivamente, y la línea 4 muestra el Fc generado mediante tratamiento con papaína de inmunoglobulinas producidas en células de animal, que muestra tamaño ligeramente mayor debido a sus unidades estructurales de azúcar en el gel SDS-PAGE que aquel producido en E. coli.

<4-2> Análisis de secuencia de terminal N

Los fragmentos Fc Ig diméricos solubles en agua, que se ubican en el citosol de E. coli como se demuestra en el anterior <4-1>, se designan para ser traducidos en una forma fusionada a una secuencia de señal. Así, para determinar si los fragmentos Fc Ig se ubican en citosol E. coli en una forma fusionada a la secuencia de señal cuando no se secreta sin el procesamiento de la secuencia de señal, las secuencias de aminoácido de terminal N de los fragmentos Fc Ig se determinan por el Instituto de Investigación de Ciencias Básicas, Seoul, Corea. Las muestras utilizadas en el análisis de secuencia de aminoácidos de terminal N se preparan como sigue.

Primero, se sumerge una membrana de PVDF (Bio-Rad) en metanol durante aproximadamente 2-3 seg para ser activada, y se humedece suficientemente con un regulador de bloqueo (170 mM glicina, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20% de metanol). Las muestras de proteína separadas en un gel SDS-PAGE no reducido, preparadas en el <4-1>

anterior, se transfieren a una membrana PVDF durante aproximadamente una hora utilizando un equipo de transferencia (Hoefer Semi-Dry Transfer unit, Amersham). Las proteínas que se transfieren en una membrana PVDF se tiñen con un tinte de proteína, Azul Coomassie R-250 (Amnesco), durante 3-4 seg, y se lavan con una solución para desteñido (agua: ácido acético: metanol = 5: 1: 4). Luego, los fragmentos que contienen las proteínas de la membrana se cortan con tijeras y se someten a análisis de secuencia de terminal N.

Como resultado, se encuentra que la proteína Fc IgG1 tiene una secuencia de terminal N de Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu- Leu-Gly-Gly, la proteína Fc IgG4 tiene una secuencia de terminal N de Ser-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Phe-Leu-Gly-Gly, y la proteína Fc IgG2 tiene una secuencia de terminal N de Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Pro-Val-Ala-Gly-Pro. Como es evidente a partir de estos resultados, se encuentra que los fragmentos Fc expresados por los transformantes E. coli de la presente invención tienen una secuencia de terminal N exacta. Estos resultados indican que, cuando se expresa en una forma fusionada a una secuencia de señal, los fragmentos Fc no se secretan en la membrana extracelular o espacio periplásmico, se procesan en forma precisa en la secuencia de señal aún luego de sobreexpresión y están presentes en una forma soluble en agua en el citosol.

Para determinar la expresión de la región constante de inmunoglobulina en los transformantes E. coli, las regiones constantes de inmunoglobulina se purifican utilizando una columna de afinidad de proteína A conocida por tener una fuerte afinidad a la inmunoglobulina, como sigue.

Las células E. coli recolectadas al centrifugar los fluidos de fermentación se interrumpen mediante un microfluizador (Microfludics) para dar lisados celulares. Los lisados celulares se someten a cromatografía de columna de dos etapas para purificar la región constante de inmunoglobulina recombinante presente en el citosol. Se equilibra 5 ml de una columna de afinidad de proteína A (Pharmacia) con PBS, y se cargan los lisados celulares en la columna en un índice de flujo de 5 ml/min. Se lavan las proteínas no unidas con PBS, y las proteínas unidas se eluyen con 100 mM citrato (pH 3.0). Las fracciones recolectadas se desalinizan utilizando una columna de desalinización HiPrep 26/10 (Pharmacia) con 10 mM regulador Tris (pH 8.0). Luego, se lleva a cabo cromatografía de columna de intercambio aniónico secundaria utilizando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia). Las regiones constantes de inmunoglobulina recombinantes purificadas primarias se cargan en una columna Q-Sefarosa HP 26/10, y la columna se eluye con un gradiente lineal de 0-0.2 M NaCl en 10 mM regulador Tris (pH 8.0), proporcionando así fracciones altamente puras. Después de ser purificada parcialmente utilizando la columna de afinidad de proteína A, se determinan los niveles de expresión de las regiones constantes Ig recombinantes, y los resultados se dan en la Tabla 2, adelante.

TABLA 2

Plásmidos	Transformantes	Niveles de expresión (mg/L) medidos después de la purificación de la Proteína A
pSTIIdCG1Fc	HM10927	400
pSTIIdCG1SFc	HM10928	100
pSTIIdCG1SFFc	HM10929	600
pSTIIG1Mo	HM10930	500
pSTIIdCG2Fc	HM10936	100
pSTIIG4CH1 3	HM10931	80
pSTIIdCG4Fc	HM10932	400
pSTIIG4H K	HM10934	50

(continuación)

Plásmidos	Transformantes	Niveles de expresión (mg/L) medidos después de la purificación de la Proteína A
pSTIIG4Mo	HM10933	600
pSTIIG1CH1 3	HM10935	80

<4-3> Análisis de proteínas expresadas

Debido a que las regiones constantes de inmunoglobulina así obtenidas están presentes en una forma dimérica o monomérica de la cadena pesada, tienen diferentes patrones de migración en SDS-PAGE reducido y SDS-PAGE no reducido. Los resultados del análisis SDS-PAGE, realizados para determinar las purezas de proteína después que se purifican los productos expresados, se dan en las FIGS. 2 y 3.

Las FIGURAS 2 y 3 muestran los resultados del análisis SDS-PAGE de la región constante de inmunoglobulina purificada en una forma dimérica o monomérica bajo condiciones reducidas y no reducidas utilizando un gel criterion (Bio-Rad), en donde las regiones constantes se evalúan para migración diferencial en geles reducidos versus no reducidos. En la FIGURA 2, la región A muestra las proteínas separadas en un gel SDS-PAGE no reducido, y la región B muestra las proteínas en un gel SDS-PAGE reducido. El carril M indica un marcador de proteína estándar de bajo rango preteñido (Bio-Rad), y los carriles 1 a 4 indican las muestras de proteína para la región constante de inmunoglobulina producida por los transformantes E. coli, HM10927, HM10928, HM10929 y HM10932 respectivamente. Como se muestra en la FIGURA 2, en el SDS-PAGE reducido, los fragmentos Fc Ig están presentes en una forma monomérica debido a que se reducen los enlaces disulfuro formados entre los residuos cisteína de la región bisagra, y así migran a la distancia del monómero. En contraste, en SDS-PAGE no reducido, los fragmentos Fc Ig están presentes en una forma dimérica mediante enlaces disulfuro y así tienen una distancia de migración de aproximadamente 42 kDa.

En la FIGURA 3, la región A muestra las proteínas separadas en un gel SDS-PAGE no reducido, y la región B muestra proteínas en un gel SDS-PAGE reducido. La carril M indica el marcador de proteína estándar, y los carriles 1 y 2 indican las muestras de proteína para las regiones constantes de inmunoglobulina producidas por los transformantes E. coli, HM10930 y HM10934, respectivamente. Como se muestra en la FIGURA 2, las proteínas no muestran una gran diferencia en la migración de geles reducidos versus no reducidos, y solo exhibe una migración ligeramente diferente debido a la reducción de enlaces disulfuro intramoleculares.

EJEMPLO 5: Ensayo de unión C1q utilizando ELISA

Para determinar si los derivados preparados en el Ejemplo 4 y las proteínas correspondientes a las regiones constantes de inmunoglobulinas, expresadas en los transformantes E. coli y purificadas, se unen a C1q humano, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) se lleva a cabo como sigue. Como grupos de prueba, se utilizan las regiones constantes de inmunoglobulina producidas por los transformantes HM10929, HM10930, HM10932 y HM10933 preparados en los Ejemplos anteriores. Como estándares; se utiliza una inmunoglobulina glucosilada (IVIGG-globulina S, Green Cross PBM). La prueba y las muestras estándar se preparan en regulador de carbonato 10 mM (pH 9.6) en una concentración de 1 µg/ml. Se hacen alícuotas de las muestras en una placa de 96 pozos (Nunc) en una cantidad de 200 ng por pozo, y la placa se cubre durante la noche a 4° C. Luego, cada pozo se lava con PBS-T (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, 0.05% Tween 20) tres veces, se bloquea con 250 µl de un regulador de bloqueo (1% de albúmina de suero bovino en PBS-T) a temperatura ambiente durante 1 hr, y se lava de nuevo con el mismo PBS-T tres veces. Se diluyen las muestras de prueba y estándar en PBS-T en una concentración predeterminada y se agrega a los pozos cubiertos con el anticuerpo, y la placa se incuba a temperatura ambiente durante 1 hr y se lava con PBST tres veces. Después de esto, se agrega 2 µg/ml de C1q (R&D Systems) a la placa y se hace reaccionar a temperatura ambiente durante 2 hrs, y la placa se lava con PBS-T seis veces. Se agrega 200 µl de una dilución 1:1000 de un conjugado de peroxidasa del anticuerpo C1q antihumano humano (Biogenesis, USA) en el regulador de bloqueo a cada pozo y se hace reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hr. Después cada pozo se lava con PBS-T tres veces, se mezclan volúmenes iguales de reactivos de color A y B (Color A: peróxido estabilizado y Color B: cromógeno estabilizado; DY 999, R&D Systems), y se agrega 200 µl de la mezcla a cada pozo, seguido por incubación durante 30 min. Luego, se agrega 50 µl de una solución de terminación de reacción, ácido sulfúrico 2 M, a cada pozo. La placa se lee utilizando un lector de microplaca (Molecular Device). La absorbancia de las muestras de prueba y estándar se mide a 450 nm, y los resultados se dan en la FIGURA 4, respectivamente.

Como se muestra en la FIGURA 4, las proteínas de las región constante de inmunoglobulina producidas en E. coli de acuerdo con la presente invención exhiben afinidad de unión notablemente reducida a C1q. Estos resultados indican que las proteínas de la región constante de inmunoglobulina de la presente invención raramente tienen el riesgo de inducir respuestas inmunes tales como citotoxicidad e inflamación en el cuerpo cuando se utiliza como un portador para los polipéptidos fisiológicamente activos en una forma conjugada.

EJEMPLO 6: Preparación y análisis farmacocinético del conjugado EPO humano

<6-1> Preparación de EPO humano

Para preparar un conjugado EPO humano (eritropoyetina), primero, se amplifica un gen EPO mediante RT-PCR utilizando ARN total aislado de glóbulos rojos y se clona en un vector pBluscript II (Stratagen), generando así un vector pBlueEP. Para transferir el gen EPO clonado dentro de un vector de expresión pCMV/dhfr- de célula de animal, el pBlueEP se digiere con HindIII y BamHI, y un fragmento que contiene el gen EPO se inserta en el vector de expresión de célula de animal tratado con la misma enzima de restricción, proporcionando así pcmvEP. Este vector de expresión que lleva un gen EPO se transfecta en células CHO que permiten la expresión de la proteína utilizando un reactivo Lipofectamina (Gibco). Las células se tratan con MTX, y concentraciones de MTX aumentadas gradualmente a 120 nM para elevar los niveles de expresión. El EPO se expresa en altos niveles, mayores de 100 mg por litro.

<6-2> Preparación del complejo EPO - PEG humano

Se mezcla 3.4-kDa de polietilenglicol que tiene un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater), con el EPO preparado en el <6-1>, disuelto en regulador de fosfato 100 mM en una cantidad de 5 mg/ml, en una relación molar EPO: PEG de 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 y 1:20. A esta mezcla, se agrega un agente de reducción, cianoborohidruro de sodio ($NaCNBH_3$, Sigma), en una concentración final de 20 mM y se le permite reaccionar a 4° C durante 2 hrs con agitación gentil para dejar que el PEG se ligue al extremo de terminal amino de EPO. Para obtener un complejo 1:1 de PEG y EPO, la mezcla de reacción se somete a cromatografía por exclusión de tamaño utilizando una columna SuperdexR (Pharmacia). El complejo EPO-PEG se eluye de la columna utilizando regulador de fosfato de potasio 10 mM (pH 6.0) como un regulador de elución, y se retira el EPO no ligado al PEG, el PEG que no ha reaccionado y los subproductos de dímero en donde el PEG se liga a las dos moléculas EPO. El complejo EPO-PEG purificado se concentra a 5 mg/ml. A través de este experimento, la relación molar de la reacción óptima para EPO a PEG, proporciona la reactividad mayor y genera la cantidad más pequeña de los subproductos tales como dímeros, se encuentra que es de 1:2.5 a 1:5.

<6-3> Preparación del conjugado del complejo EPO -PEG humano y la región constante de inmunoglobulina recombinante

El complejo EPO-PEG preparado en el <6-2> se liga a una región constante de inmunoglobulina producida por el HM10929 en el <4-3> del Ejemplo 4. En detalle, el fragmento de la región constante de inmunoglobulina (aproximadamente 53 kDa) preparado en el <4-3> se disuelve en regulador de fosfato 10 mM y se mezcla con el complejo EPO-PEG en un complejo EPO-PEG: relación molar de la región constante de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después que se ajusta la concentración de regulador de fosfato de la solución de reacción a 100 mM, se agrega un agente de reducción, $NaCNBH_3$, a la solución de reacción en una concentración final de 20 mM y se le permite reaccionar a 4° C durante 20 hrs con agitación gentil. A través de este experimento, la relación molar de la relación óptima para el complejo EPO-PEG al fragmento de la región constante, proporciona mayor reactividad y genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se encuentra que es de 1:2.

Después de la reacción de acoplamiento, la mezcla de reacción se somete a cromatografía líquida de alta presión con el fin de eliminar sustancias y subproductos que no reaccionan. La solución de reacción de acoplamiento se desaliniza utilizando una columna de desalinización HiPrep 26/10 (Pharmacia) con regulador Tris 10 mM (pH 8.0). Luego, la solución de reacción se carga en 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) en un índice de flujo de 8 ml/min, y esta columna se eluye con un gradiente lineal NaCl de 0-0.2 M para obtener las fracciones deseadas. Las fracciones recolectadas se cargan de nuevo en una columna polyCAT 21.5_250 equilibrada con regulador de acetato 10 mM (pH 5.2) en un índice de flujo de 15 ml/min, y esta columna se eluye con un gradiente lineal NaCl de 0.1-0.3 M, proporcionando así fracciones altamente puras.

<6-4> Análisis farmacocinético

El EPO natural preparado en el <5-1> del Ejemplo 5, Aranesp (Amgen) que tiene mayor contenido de ácido siálico aumenta la vida útil, y el conjugado EPO-PEG-Fc (grupo de prueba) preparado en el <5-3> del Ejemplo 5 se inyecta subcutáneamente en una dosis de 100 µg/kg a cinco ratas SD por grupo.

Después de la inyección subcutánea, se recolectan muestras de sangre a 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 y 48 hrs en los grupos de control, y, en los grupos de prueba, a 1, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240, 288, 336 y 384 hrs. Se recolectan las muestras de sangre en tubos de 1.5 ml, se coagulan, y se centrifugan durante 10 min utilizando un micro centrifugador de alta velocidad Eppendorf para retirar los glóbulos. Se miden los niveles de proteína de suero mediante ELISA utilizando un anticuerpo específico a EPO.

La Tabla 3, adelante, y la FIGURA 5 muestran la vida útil del suero de la proteína natural y el conjugado de proteína, respectivamente. El conjugado de proteína EPO-PEG-Fc (E. coli), preparado utilizando la región constante de inmunoglobulina producida de acuerdo con la presente invención como un portador, exhibe una mayor vida útil del suero que el EPO natural. Esta vida útil extendida se encuentra que es mayor que aquella de Aranesp, un EPO hiperglucosilado que tiene una mayor vida útil del suero.

TABLA 3

	EPO	Conjugado de EPO-PEG-Fc	EPO altamente glucosilado
C_{max} (ng/ml) C_{max} [1] (ng/ml)	103.9	411.6	305.0
T_{max} [2] (hr)	12.0	48.0	12.0
T1/2 [3] (hr)	6.1	66.7	11.6
AUC[4] (ng.hr/ml)	2310.5	65203	12117
MRT [5](hr)	14.5	118.2	30.3

[1]Concentración máxima de suero

[2]Tiempo tomado para lograr la concentración máxima del fármaco

[3]Vida útil del suero de un fármaco

[4]Área bajo la curva de concentración de suero versus tiempo

[5]Tiempo medio en que la molécula de fármaco reside en el cuerpo

Aplicabilidad Industrial

Como se describió aquí anteriormente, el método actual permite la producción en masa de una región constante de inmunoglobulina en una forma soluble en agua utilizando una secuencia de señal de enterotoxina II estable al calor E. coli. La región constante de inmunoglobulina producida es útil cuando se liga a una proteína fisiológicamente activa para mejorar la vida útil del suero y la actividad fisiológica de la proteína fisiológicamente activa sin riesgo de inducir respuestas inmunes.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

Para Kyung – yoon Min Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd. 893- 3, Hajeo- ri, Paltan- myeon, Hwaseong – si; Gyeonggi – do, Corea

RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10927	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM – 10588
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: □ una descripción científica □ una designación taxonómica propuesta (Marque con una equis cuando aplique)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este en Septiembre 15, 2004 (fecha del depósito original)[1].	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361- 221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun- gu SEOUL 120- 091 República de Corea	Firmas de personas que tienen la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados: Fecha: Sep. 21, 2004.

[1] En donde aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estado de autoridad depositaria internacional; en donde un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que se recibe el microorganismo por la autoridad depositaria internacional.

Forma BP/4 Única página

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

Para Kyung – yoon Min Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd. 893- 3, Hajeo- ri, Paltan- myeon, Hwaseong – si; Gyeonggi – do, Corea	RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10928	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM – 10589
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: □ una descripción científica □ una designación taxonómica propuesta (Marque con una equis cuando aplique)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este en Septiembre 15, 2004 (fecha del depósito original)[1].	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361- 221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun- gu SEOUL 120- 091 República de Corea	Firmas de personas que tienen la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados: Fecha: Sep. 21, 2004.

[1] En donde aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estado de autoridad depositaria internacional; en donde un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que se recibe el microorganismo por la autoridad depositaria internacional.

Forma BP/4 Única página

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

Para Kyung – yoon Min Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd. 893- 3, Hajeo- ri, Paltan- myeon, Hwaseong – si; Gyeonggi – do, Corea	RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10929	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM – 10594
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: □ una descripción científica □ una designación taxonómica propuesta (Marque con una equis cuando aplique)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este en Septiembre 15, 2004 (fecha del depósito original)[1].	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361- 221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun- gu SEOUL 120- 091 República de Corea	Firmas de personas que tienen la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados: Fecha: Sep. 21, 2004.

[1] En donde aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estado de autoridad depositaria internacional; en donde un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que se recibe el microorganismo por la autoridad depositaria internacional.

Forma BP/4 Única página

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

Para Kyung – yoon Min Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd. 893- 3, Hajeo- ri, Paltan- myeon, Hwaseong – si; Gyeonggi – do, Corea	RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10930	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM – 10595
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: □ una descripción científica □ una designación taxonómica propuesta (Marque con una equis cuando aplique)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este en Septiembre 15, 2004 (fecha del depósito original)[1].	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361- 221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun- gu SEOUL 120- 091 República de Corea	Firmas de personas que tienen la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados: Fecha: Sep. 21, 2004.

[1] En donde aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estado de autoridad depositaria internacional; en donde un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que se recibe el microorganismo por la autoridad depositaria internacional.

Forma BP/4 Única página

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

Para Kyung – yoon Min Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd. 893- 3, Hajeo- ri, Paltan- myeon, Hwaseong – si; Gyeonggi – do, Corea

RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10931	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM – 10596
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: □ una descripción científica □ una designación taxonómica propuesta (Marque con una equis cuando aplique)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este en Septiembre 15, 2004 (fecha del depósito original)[1].	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361- 221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun- gu SEOUL 120- 091 República de Corea	Firmas de personas que tienen la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados: Fecha: Sep. 21, 2004.

[1] En donde aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estado de autoridad depositaria internacional; en donde un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que se recibe el microorganismo por la autoridad depositaria internacional.

Forma BP/4 Única página

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

Para Kyung – yoon Min Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd. 893- 3, Hajeo- ri, Paltan- myeon, Hwaseong – si; Gyeonggi – do, Corea

RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10932	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM – 10597
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: □ una descripción científica □ una designación taxonómica propuesta (Marque con una equis cuando aplique)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este en Septiembre 15, 2004 (fecha del depósito original)[1].	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361- 221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun- gu SEOUL 120- 091 República de Corea	Firmas de personas que tienen la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados: Fecha: Sep. 21, 2004.

[1] En donde aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estado de autoridad depositaria internacional; en donde un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que se recibe el microorganismo por la autoridad depositaria internacional.

Forma BP/4 Única página

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

Para Kyung – yoon Min Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd. 893- 3, Hajeo- ri, Paltan- myeon, Hwaseong – si; Gyeonggi – do, Corea

RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10933	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM – 10598
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: □ una descripción científica □ una designación taxonómica propuesta (Marque con una equis cuando aplique)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este en Septiembre 15, 2004 (fecha del depósito original)[1].	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361- 221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun- gu SEOUL 120- 091 República de Corea	Firmas de personas que tienen la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados: Fecha: Sep. 21, 2004.

[1] En donde aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estado de autoridad depositaria internacional; en donde un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que se recibe el microorganismo por la autoridad depositaria internacional.

Forma BP/4 Única página

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

Para Kyung – yoon Min Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd. 893- 3, Hajeo- ri, Paltan- myeon, Hwaseong – si; Gyeonggi – do, Corea

RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10934	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM – 10599
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: □ una descripción científica □ una designación taxonómica propuesta (Marque con una equis cuando aplique)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este en Septiembre 15, 2004 (fecha del depósito original)[1].	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361- 221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun- gu SEOUL 120- 091 República de Corea	Firmas de personas que tienen la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados: Fecha: Sep. 21, 2004.

[1] En donde aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estado de autoridad depositaria internacional; en donde un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que se recibe el microorganismo por la autoridad depositaria internacional.

Forma BP/4 Única página

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

Para Kyung – yoon Min Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd. 893- 3, Hajeo- ri, Paltan- myeon, Hwaseong – si; Gyeonggi – do, Corea

RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10935	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM – 10600
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: □ una descripción científica □ una designación taxonómica propuesta (Marque con una equis cuando aplique)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este en Septiembre 15, 2004 (fecha del depósito original)[1].	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361- 221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun- gu SEOUL 120- 091 República de Corea	Firmas de personas que tienen la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados: Fecha: Sep. 21, 2004.

[1] En donde aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estado de autoridad depositaria internacional; en donde un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que se recibe el microorganismo por la autoridad depositaria internacional.

Forma BP/4 Única página

<110> HANMI PHARM. IND. CO., LTD.

<120> Método para la producción en masa de la región constante de inmunoglobulina

<150> KR10-2003-0080299 <151> 2003-11-13

<160> 46

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

cccaagcttg cctccaccaa gggcccatcg gtcttcc 37

<210> 2

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

gggggatcct catttacccg gagacaggga gag 33

<210> 3

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 3

cccaagcttg acatccagtt gacccagtct ccatc 35

<210> 4

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 4

gggggatcct caacactctc ccctgttgaa gctctt 36

<210> 5

<211> 990

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 6

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

<210> 7

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 7

cggcctccac caagggccca tcggtcttcc 30

<210> 8

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 8

cgccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gac 33

<210> 9

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 9

cgtcatgccc agcacctgaa ctcctggggg gac 33

<210> 10

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 10

cgtcatgccc agcacctgag ttcctggggg gacca 35

<210> 11

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 11

cggcacctga actcctgggg ggaccg 26

<210> 12

<211> 69

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 12

atgaaaaaga caatcgcatt tcttcttgca tctatgttcg ttttttctat tgctacaaat 60

gcccaggcg 69

<210> 13

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 13

tctattgcta caaatgccca ggccttccca accattccct tatcc 45

<210> 14

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 14

agataacgat gtttacgggt ccggaagggt tggtaaggga atagg 45

<210> 15

<211> 984

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

```
gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag     60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg    120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc    240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc    300
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc    360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg    420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat    480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac    540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag    600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa    660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag    720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag    780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc    840
gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg    900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc    960
ctctccctgt ctctgggtaa atga                                           984
```

<210> 16

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 16

cgtcatgccc agcacctgag ttcctggggg gacca 35

<210> 17

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 17

gggggatcct catttaccca gagacaggga gaggctcttc tg 42

<210> 18

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 18

cggcacctga gttcctgggg ggaccatca 29

<210> 19

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 19

cggcttccac caagggccca tccgtcttcc 30

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 20

cgcgaactgt ggctgcacca t 21

<210> 21

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
115 120 125

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
195 200 205

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 22

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ser Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
115 120 125

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
195 200 205

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 23

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
115 120 125

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
195 200 205

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 24

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 25

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 27

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 29

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

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

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
115 120 125

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
195 200 205

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 30

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 31

<211> 29

<212> ADN

<213> cebador

<400> 31

cgccgtgccc agcacctccg gtggcggga 29

<210> 32

<211> 33

<212> ADN

<213> cebador

<400> 32

gggggatcct catttacccg gagacaggga gag 33

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 35

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
20 25 30

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
35 40 45

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
50 55 60

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
65 70 75 80

Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
85 90 95

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
115 120 125

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
130 135 140

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
145 150 155 160

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
165 170 175

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
180 185 190

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
195 200 205

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 36

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 36

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala

<210> 37

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 37

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala
20

<210> 38

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 38

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala
20

<210> 39

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 39

Met Lys Lys Lys Thr Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala
20

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 40

Met Lys Lys Ser Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala
20

<210> 41

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 41

Met Lys Lys Ser Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala
20

<210> 42

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 42

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser

1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala
20

<210> 43

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 43

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Leu Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala
20

<210> 44

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 44

Met Lys Lys Lys Ser Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala
20

<210> 45

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 45

Met Val Lys Lys Thr Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala
20

<210> 46

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 46

Met Lys Lys Lys Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala
20

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una región constante de inmunoglobulina, que comprende:

transformar una célula procariótica con un vector de expresión recombinante que incluye una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de señal de enterotoxina II estable al calor y una secuencia de nucleótido que codifica una región constante de inmunoglobulina;

cultivar un transformante resultante; y aislar y purificar la región constante de inmunoglobulina producida por el transformante, en donde la región constante de inmunoglobulina se expresa en el citoplasma en forma soluble en agua.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región constante de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste de las regiones constantes de IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, y combinaciones e híbridos de los mismos.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el IgG se selecciona del grupo que consiste de las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y combinaciones e híbridos de los mismos.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la región constante de inmunoglobulina es una región constante IgG4.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la región constante de inmunoglobulina es una región constante IgG4 aglucosilada humana.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región constante de inmunoglobulina se compone de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste de CH1, CH2, CH3, CH4 y los dominios CL.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la región constante de inmunoglobulina comprende adicionalmente una región bisagra.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótido que codifica una región constante de cadena pesada y una secuencia de nucleótido que codifica una región constante de cadena ligera.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región constante de inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos representado por la SEQ ID NO. 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 34 o 35.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido de señal de enterotoxina II estable al calor tiene una secuencia de aminoácidos representado por la SEQ ID NO. 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 o 46.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el transformante es E. coli BL21/pSTIIGlCHl3 (HM10935; No. de Depósito KCCM-10600), BL2 1/pSTIIdCGlFc (HM10927; No. de Depósito KCCM-10588), BL21/pSTIIdGGlSFc (HM10928; No. de Depósito KCCM-10589), BL21/pSTIIdCGlSFFc (HM10929; No. de Depósito KCCM-10594), BL21/pSTIIGlMo (HM10930; No. de Depósito KCCM-10595), BL21/pSTIIdCG4Fc (HM10932; No. de Depósito KCCM-10597), BL21/pSTIIG4CHl3 (HM 10931; No. de Depósito KCCM-10596), BL21/pSTIIG4Mo (HM10933; No. de Depósito KCCM- 10598), o BL21/pSTIIG4HK (HM10934; No. de Depósito KCCM-10599).

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el transformante es E. coli.

FIG. 1

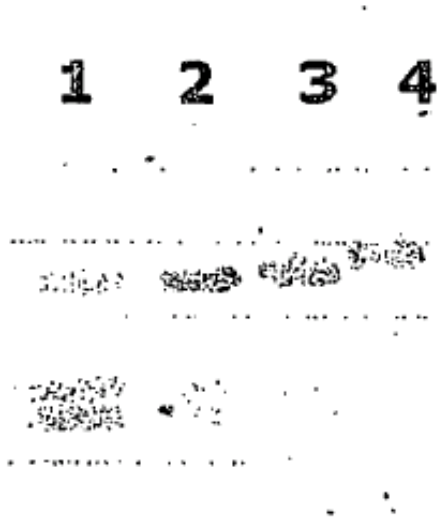


FIG. 2

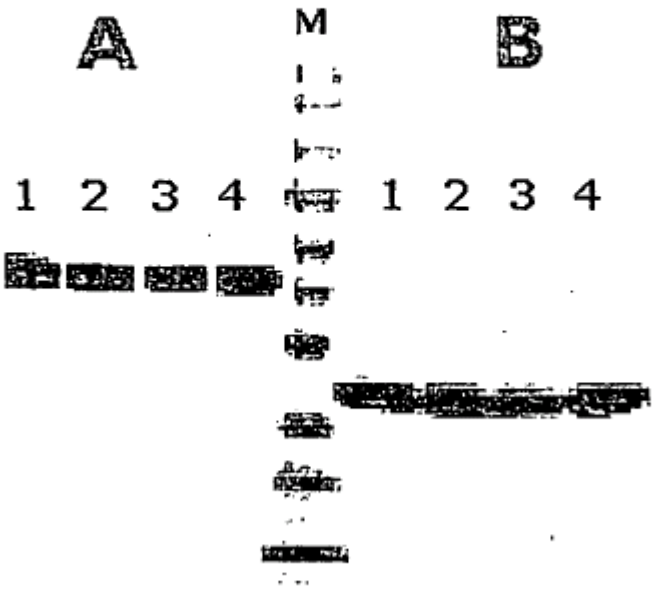


FIG. 3

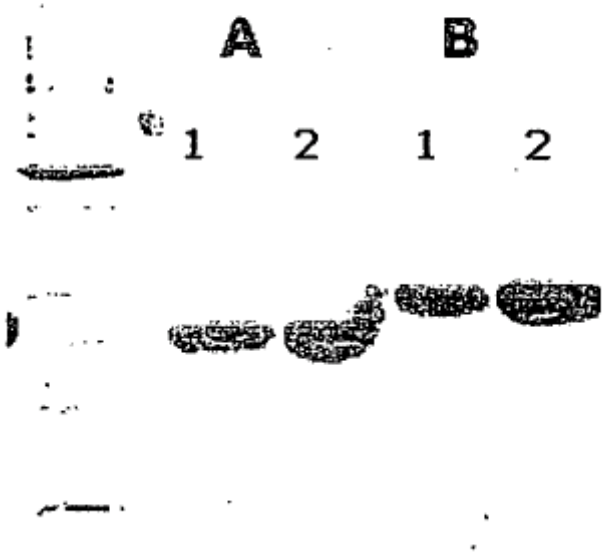


FIG. 4

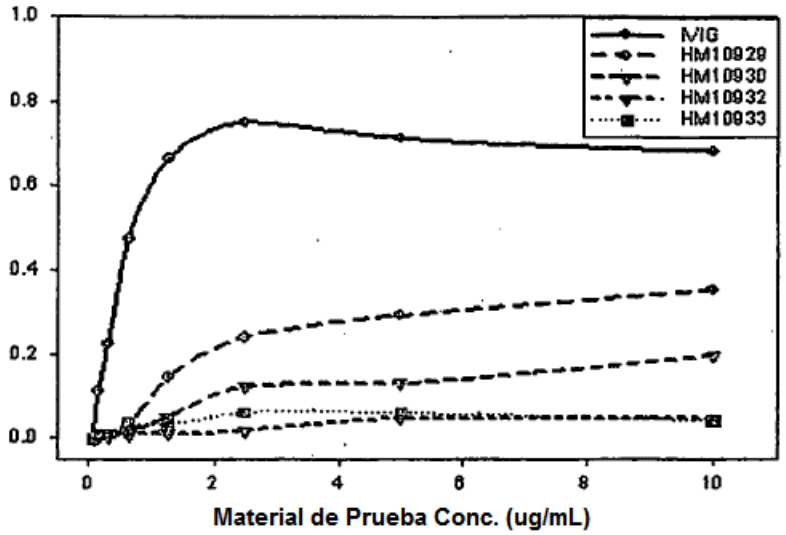
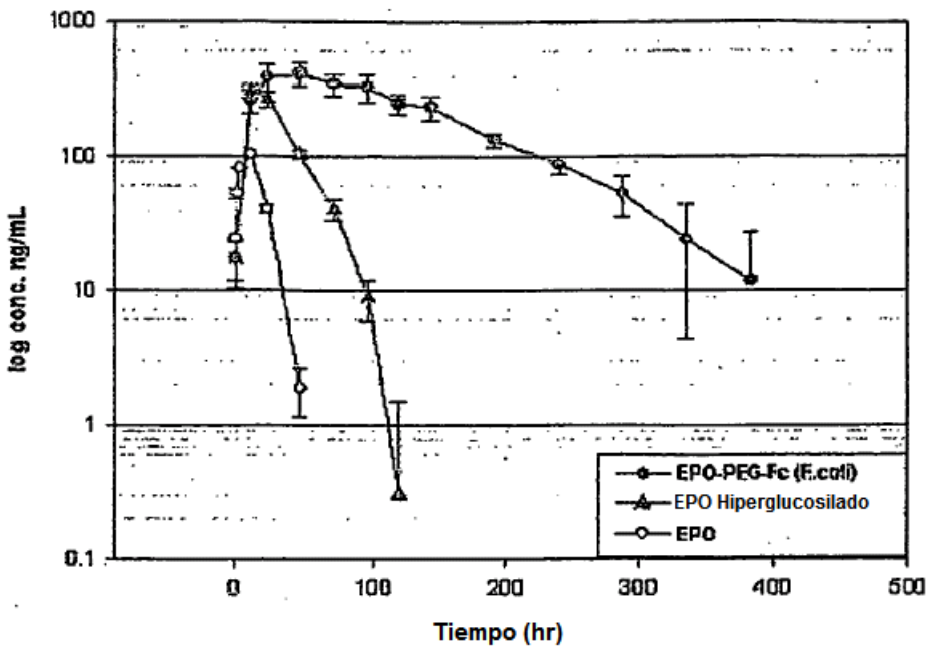

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
2
4
6
8
10
Material de Prueba Conc. (ug/mL)
MG
HM10929
HM10930
HM10932
HM10933

FIG. 5


1000
100
10
1
0.1
log conc. ng/mL
0
100
200
300
400
500
Tiempo (hr)
EPO-PEG-Fc (E.coli)
EPO Hiperglucosilado
EPO