

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 977**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09168970 .3**
96 Fecha de presentación: **20.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **2116259**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

54 Título: **Proteínas de fusión de taci-inmunoglobulina**

30 Prioridad:
24.05.2001 US 293343 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2012

73 Titular/es:
**ZYMOGENETICS, INC.
1201 EASTLAKE AVENUE EAST
SEATTLE, WASHINGTON 98102, US**

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

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 379 977 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina

Campo técnico

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

Antecedentes de la invención

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

15 Los receptores que se unen a citocinas están normalmente compuestos por una o más proteínas integrales de membrana que se unen a la citocina con alta afinidad y transducen este acontecimiento de unión a la célula mediante las porciones citoplásmicas de ciertas subunidades de receptor. Los receptores de citocinas se han agrupado en varias clases basándose de similitudes en sus dominios de unión a ligando extracelular. Por ejemplo, las cadenas de receptores responsables de la unión y/o transducción del efecto de interferones son miembros de la familia de receptores de citocinas de tipo II, basados en un dominio extracelular de 200 residuos característico.

20 Las interacciones celulares que se producen durante una respuesta inmunitaria están reguladas por miembros de varias familias de receptores de la superficie celular que incluyen la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR). La familia de TNFR consiste en varios receptores de glicoproteínas integrales de membrana muchos de las cuales, conjuntamente con sus ligandos respectivos, regulan interacciones entre diferentes linajes de células hematopoyéticas (véanse, por ejemplo, Cosman, Stem Cells 12:440 (1994); Wajant y col., Cytokine Growth Factor Rev. 10:15 (1999); Yeh y col., Immunol. Rev. 169:283 (1999); Idriss y Naismith, Microsc. Res. Tech. 50:184 (2000)).

25 Un receptor tal es TACI, interactor de activador transmembrana y de CAML (von Bülow y Bram, Science 228: 138 (1997); Bram y von Bülow, patente de EE.UU. nº 5.969.102 (1999)). El TACI es un receptor unido a membrana que tiene un dominio extracelular que contiene dos pseudo-repeticiones ricas en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico que interacciona con CAML (modulador de calcio y ligando de ciclofilina), una proteína integral de membrana localizada en vesículas intracelulares que es un coinductor de la activación de NF-AT cuando se expresa en exceso en células Jurkat. TACI está asociado a linfocitos B y un subconjunto de linfocitos T. Las secuencias de nucleótidos que codifican TACI y su secuencia de aminoácidos correspondiente se proporcionan en este documento como SEC ID Nº: 1 y 2, respectivamente

30 El receptor de TACI se une a dos miembros de la familia de ligando del factor de necrosis tumoral (TNF). Un ligando se designa de forma muy diversa ZTNF4, "BAFF", "neutrocina- α ", "BlyS", "TALL-1" y "THANK" (Yu y col., publicación internacional nº WO98/18921 (1998), Moore y col., Science 285:269 (1999); Mukhopadhyay y col., J. Biol. Chem. 274:15978 (1999); Schneider y col., J. Exp. Med. 189:1747 (1999); Shu y col., J. Leukoc. Biol. 65:680 (1999)). La secuencia de aminoácidos de ZTNF4 se proporciona como SEC ID Nº: 3. El otro ligando se ha designado "ZTNF2", "APRIL" y "ligando 1 de muerte de TNRF" (Hahne y col., J. Exp. Med. 188:1185 (1998); Kelly y col., Cancer Res. 60:1021 (2000)). La secuencia de aminoácidos de ZTNF2 se proporciona como SEC ID Nº: 4. Ambos ligandos también están unidos por el receptor de maduración de linfocitos B (BCMA) (Gross y col., Nature 404:995 (2000)). La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de BCMA se proporcionan como SEC ID Nº: 26 y SEC ID Nº: 27, respectivamente.

35 Las actividades *in vivo* demostradas de los receptores del factor de necrosis tumoral ilustran el potencial clínico de las formas solubles del receptor. Se han generado formas solubles del receptor de TACI como proteínas de fusión de inmunoglobulina. Las versiones iniciales produjeron proteína heterogénea de baja expresión. La heterogeneidad se observó en el extremo amino de TACI, en el extremo carboxilo de Fc y en la región del tallo de TACI. Por tanto, existe una necesidad de composiciones de receptores de TACI farmacéuticamente útiles.

El documento WO 00/40716 describe el receptor soluble BR43x2 y procedimientos de uso del mismo para terapia. El documento WO 01/81417 describe el uso de TACI como agente antitumoral.

55 La presente invención proporciona una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para su uso en la inhibición de la proliferación

de células tumorales, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, para su uso en el tratamiento de asma, bronquitis o enfisema, para su uso en el tratamiento de enfermedad renal, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a inmunosupresión, rechazo de injerto, enfermedad de injerto frente a huésped, inflamación, dolor de articulaciones, hinchazón, anemia y choque séptico, o para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado de neoplasia, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad linfoproliferativa postrasplante y gammapatía de cadenas ligeras, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

(a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
- (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
- (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y

(b) un resto de inmunoglobulina.

La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir la proliferación de células tumorales que comprende administrar a dichas células tumorales una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TA-CI)-inmunoglobulina en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

(a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
- (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
- (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y

(b) un resto de inmunoglobulina.

La invención proporciona además una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

(a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
- (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
- (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y

(b) un resto de inmunoglobulina;

y en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina consiste en o comprende una forma secretada de una cualquiera de SEC ID N°: 50, 52, 54 ó 56.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de TACI humano. Las localizaciones de las pseudo-repeticiones ricas en cisteína están indicadas sombreadas, el dominio transmembrana está recuadrado y la región del tallo se indica por marcas numeradas.

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

Las Figuras 3A, 3B, 3C y 3D muestran una comparación de la secuencia de aminoácidos de Fc de la región constante γ 1 humana natural con variantes Fc-488, Fc4, Fc5, Fc6, Fc7 y Fc8. El dominio C_{H1} de la región constante γ 1 humana no es parte de Fc y, por tanto, no se muestra. Se indica la localización de la región bisagra, los dominios C_{H2} y C_{H3}. Se indican los residuos Cys normalmente implicados en los enlaces disulfuro

con la región constante de la cadena ligera (LC) y la región constante de la cadena pesada (HC). Un símbolo “.” indica identidad con el tipo natural en esa posición, mientras que “****” indica la localización del extremo carboxilo, e ilustra la diferencia en el extremo carboxilo de Fc6 con respecto a las otras versiones de Fc. Las localizaciones de aminoácidos están indicadas por posiciones del índice EU.

La Figura 4 muestra la unión específica de ¹²⁵I-ZTNF4 a diversas construcciones de TACI-Fc. Las proteínas de fusión de TACI-Fc tuvieron restos de TACI que carecieron de los 29 primeros residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2. Una de las proteínas de fusión tuvo un resto de TACI con una región del tallo intacta (TACI (d1-29)-Fc5), mientras que tres de las proteínas de fusión TACI-Fc tuvieron restos de TACI con diversas deleciones en la región del tallo (TACI (d1-29, d107-154)-Fc5; TACI (d1-29, d111-154)-Fc5; TACI (d1-29, d120-154)-Fc5). Los detalles experimentales se describen en el Ejemplo 4.

Descripción detallada de la invención

1. Visión general

Como se describe más adelante, la presente invención proporciona proteínas de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina, y usos de las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la presente invención proporciona inhibir la proliferación de células tumorales usando una composición que comprende proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina como se definen en las reivindicaciones. Una composición tal puede administrarse a células cultivadas *in vitro*. Alternativamente, la composición puede ser una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina, y la composición farmacéutica puede ser para administración a un sujeto que tiene un tumor. El sujeto puede ser un sujeto mamífero. La administración de la composición farmacéutica puede inhibir, por ejemplo, la proliferación de linfocitos B en un sujeto mamífero.

La presente memoria descriptiva proporciona inhibir la actividad de ZTNF4 en un mamífero usando una composición que comprende una TACI-inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones. La actividad de ZTNF4 puede asociarse a diversas enfermedades y trastornos. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina puede usarse para tratar una enfermedad autoinmunitaria tal como lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil de evolución poliarticular y artritis psoriásica. Alternativamente, una composición farmacéutica que comprende una TACI-inmunoglobulina puede usarse para tratar un trastorno tal como asma, bronquitis, enfisema e insuficiencia renal terminal. Una composición farmacéutica que comprende una TACI-inmunoglobulina también puede usarse para tratar enfermedad renal tal como glomerulonefritis, vasculitis, nefritis, amiloidosis y pielonefritis, o un trastorno tal como neoplasia, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad linfoproliferativa postrasplante y gammapatía de cadenas ligeras. En ciertos casos, la actividad de ZTNF4 puede asociarse a linfocitos T. Una composición farmacéutica que comprende una TACI-inmunoglobulina también puede usarse para tratar una enfermedad o trastorno asociado a inmunosupresión, rechazo de injerto, enfermedad de injerto frente a huésped e inflamación. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende una TACI-inmunoglobulina puede usarse para disminuir inflamación y para tratar trastornos tales como dolor de articulaciones, hinchazón, anemia y choque séptico.

La presente memoria descriptiva describe reducir los niveles de ZTNF4 en sangre en circulación en un sujeto mamífero que comprende administrar al sujeto mamífero una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina, en el que la administración de la composición farmacéutica reduce el nivel en circulación de ZTNF4 en la sangre del sujeto mamífero. Como ilustración, la administración de una composición farmacéutica tal puede reducir los niveles de ZTNF4 en sangre en circulación al menos el 10%, al menos el 20%, al menos del 10 al 60%, al menos el 20 al 50%, o al menos del 30 al 40%, en comparación con el nivel de ZTNF4 en sangre antes de la administración de la composición farmacéutica. Aquellos expertos en la materia pueden medir niveles de ZTNF4 en circulación. Procedimientos ilustrativos se describen en el Ejemplo 4 y el Ejemplo 5.

Como se describe más adelante, las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina ilustrativas comprenden:

- (a) un resto del receptor de TACI que consiste en la secuencia de aminoácidos de residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2, residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2, y (ii) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2, y en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4, y
- (b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

Restos del receptor de TACI incluyen: polipéptidos que comprenden los residuos de aminoácidos 34 a 66 de SEC ID N°: 2 y los residuos de aminoácidos 71 a 104 de SEC ID N°: 2; polipéptidos que comprenden los residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2; polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2.

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

Las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina descritas en este documento pueden ser multímeros tales como dímeros.

La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina. Una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina se proporciona por SEC ID N°: 53.

La presente memoria descriptiva describe receptores solubles de TACI que consisten en un fragmento de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2 en la que el receptor soluble de TACI comprende al menos uno de (i) residuos de aminoácidos 34 a 66 de SEC ID N°: 2, y (ii) residuos de aminoácidos 71 a 104 de SEC ID N°: 2, y en el que el receptor soluble de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4. Otros receptores solubles de TACI se describen en este documento como restos del receptor de TACI adecuados para las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina. Además, los receptores solubles de TACI pueden usarse en procedimientos descritos para las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos. Además, a continuación se identifican diversas referencias.

2. Definiciones

En la siguiente descripción, varios términos se usan extensivamente. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar el entendimiento de la invención.

Como se usa en este documento, "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquiera de ligación, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasas. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos que se producen naturalmente (tales como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos que se producen naturalmente (por ejemplo, formas α -enantioméricas de nucleótidos que se producen naturalmente), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcares incluyen, por ejemplo, sustitución de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden estar funcionalizados como éteres o ésteres. Además, todo el resto de azúcar puede reemplazarse con estructuras estérica y electrónicamente similares tales como aza-azúcares y análogos de azúcares carbocíclicos. Ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos muy conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden ligarse por enlaces fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares. El término "molécula de ácido nucleico" también incluye los llamados "ácidos nucleicos peptídicos" que comprenden bases de ácidos nucleicos que se producen naturalmente o modificadas unidas a un esqueleto de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser tanto monocatenarios como bicatenarios.

El término "complemento de una molécula de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' (SEC ID N°: 57) es complementaria a 5' CCCGTGCA 3' (SEC ID N°: 58).

El término "cóntigo" denota una molécula de ácido nucleico que tiene una extensión contigua de secuencia idéntica o complementaria a otra molécula de ácido nucleico. Se dice que las secuencias contiguas se "solapan" una extensión dada de una molécula de ácido nucleico tanto en su extensión completa como a lo largo de una extensión parcial de la molécula de ácido nucleico.

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

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

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

Una “construcción de moléculas de ácido nucleico” es una molécula de ácido nucleico tanto monocatenaria como bicatenaria que ha sido modificada por intervención humana para contener segmentos de ácido nucleico combinados y yuxtapuestos en una disposición que no existe en la naturaleza.

“ADN lineal” denota moléculas de ADN no circular que tienen extremos 5' y 3' libres. El ADN lineal puede prepararse a partir de moléculas de ADN circulares cerradas tales como plásmidos, por digestión enzimática o rotura física.

“ADN complementario (ADNc)” es una molécula de ADN monocatenario que se forma a partir de un molde de ARNm por la enzima transcriptasa inversa. Normalmente se emplea un cebador complementario a las porciones de ARNm para la iniciación de la transcripción inversa. Aquellos expertos en la materia también usan el término “ADNc” para referirse a una molécula de ADN bicatenario que consiste en una molécula de ADN monocatenario de este tipo y su hebra de ADN complementaria. El término “ADNc” también se refiere a un clon de una molécula de ADNc sintetizado a partir de un molde de ARN.

Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Normalmente, un promotor se localiza en la región no codificante 5' de un gen, proximal al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de los promotores que funcionan en la iniciación de la transcripción se caracterizan frecuentemente por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión a ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de la diferenciación (DSE; McGehee y col., *Mol. Endocrinol.* 7:551 (1993)), elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta a suero (SRE; Treisman, *Seminars in Cancer Biol.* 1:47 (1990)), elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción tales como CRE/ATF (O'Reilly y col., *J. Biol. Chem.* 267: 19938 (1992)), AP2 (Ye y col., *J. Biol. Chem.* 269:25728 (1994)), SP1, proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB; Loeken, *Gene Expr.* 3:253 (1993)) y factores octámeros (véanse, en general, Watson y col., eds., *Molecular Biology of the Gene*, 4ª ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), y Lemaigre y Rousseau, *Biochem. J.* 303:1 (1994)). Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. A diferencia, la tasa de transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen promotores represibles.

Un “promotor mínimo” contiene secuencias de nucleótidos esenciales para la función del promotor que incluyen la caja TATA y el inicio de la transcripción. Por esta definición, un promotor mínimo puede o puede no tener actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potenciar la actividad o conferir actividad específica de tejido.

Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor mínimo. Por ejemplo, un elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une a factores celulares permitiendo la transcripción exclusivamente o preferencialmente en células, tejidos u orgánulos particulares. Estos tipos de elementos reguladores están normalmente asociados a genes que se expresan de un modo “específico de célula”, “específico de tejido” o “específico de orgánulo”.

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

“ADN heterólogo” se refiere a una molécula de ADN, o a una población de moléculas de ADN, que no existe naturalmente dentro de una célula huésped dada. Moléculas de ADN heterólogo para una célula huésped particular pueden contener ADN derivado de especies de la célula huésped (es decir, ADN endógeno), siempre y cuando ese ADN huésped se combine con ADN no huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no huésped que codifica un polipéptido operativamente ligado a un segmento de ADN huésped que comprende un promotor de la transcripción se considera que es una molécula de ADN heterólogo. En cambio, una molécula de ADN heterólogo puede comprender un gen endógeno operativamente ligado a un promotor exógeno. Como otra ilustración, se considera que una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula natural es ADN heterólogo si esa molécula de ADN se introduce en una célula mutante que carece del gen natural.

Un “polipéptido” es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, tanto si se produce naturalmente como sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos se denominan comúnmente en lo sucesivo “péptidos”.

Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptidos. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos tales como grupos hidrato de carbono. Los hidratos de carbono y

otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína por la célula en la que la proteína se produce, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en este documento en términos de sus estructuras de esqueletos de aminoácidos; sustituyentes tales como grupos hidrato de carbono son generalmente no especificados, pero sin embargo pueden estar presentes.

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

Un “elemento genético integrado” es un segmento de ADN que ha sido incorporado en un cromosoma de una célula huésped después de que el elemento se introdujera en la célula por manipulación humana. Dentro de la presente invención, los elementos genéticos integrados se derivan lo más comúnmente de plásmidos linealizados que se introducen en las células por electroporación u otras técnicas. Los elementos genéticos integrados son pasados de la célula huésped original a su progenie.

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

Un “vector de expresión” es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula huésped. Normalmente, un vector de expresión comprende un promotor de la transcripción, un gen y un terminador de la transcripción. La expresión génica se sitúa normalmente bajo el control de un promotor, y se dice que un gen tal está “operativamente ligado a” el promotor. Similarmente, un elemento regulador y un promotor mínimo están operativamente ligados si el elemento regulador modula la actividad del promotor mínimo.

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

“Transformantes integrativos” son células huésped recombinantes en las que el ADN heterólogo se ha integrado en el ADN genómico de las células.

Una “proteína de fusión” es una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos de al menos dos genes. Por ejemplo, una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende un resto del receptor de TACI y un resto de inmunoglobulina. Como se usa en este documento, un “resto del receptor de TACI” es una parte del dominio extracelular del receptor de TACI que se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4. El término un “resto de inmunoglobulina” se refiere a un polipéptido que comprende una región constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, el resto de inmunoglobulina puede comprender una región constante de la cadena pesada. El término proteína de fusión de “TACI-Fc” se refiere a una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina en la que el resto de inmunoglobulina comprende las regiones constantes de la cadena pesada de la inmunoglobulina, C_{H2} y C_{H3}.

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

Los receptores pueden estar unidos a membrana, ser citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, receptor de la hormona estimulante tiroidea, receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (por ejemplo, receptor de PDGF, receptor de la hormona de crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6). Los receptores unidos a membrana se caracterizan por una estructura multi-dominio que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio efector intracelular que normalmente participa en la transducción de señales. En ciertos receptores unidos a membrana, el dominio de unión a ligando extracelular y el dominio efector intracelular se localizan en polipéptidos separados que comprenden el receptor funcional completo.

En general, la unión de ligando a receptor produce un cambio conformacional en el receptor que produce una interacción entre el dominio efector y otra(s) molécula(s) en la célula, que a su vez conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que frecuentemente están ligados a las interacciones receptor-ligando incluyen transcripción de genes, fosforilación, desfosforilación, aumento en la producción de AMP cíclico, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de la membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos.

El término “secuencia señal secretora” denota una secuencia de ADN que codifica un péptido (un “péptido secretor”) que, como componente de un polipéptido mayor, dirige al polipéptido mayor por una ruta secretora de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido mayor se escinde comúnmente para eliminar el péptido secretor durante el tránsito por la ruta secretora.

5 Un “polipéptido aislado” es un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes tales como hidrato de carbono, lípido u otras impurezas proteínicas asociadas al polipéptido en la naturaleza. Normalmente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, al menos aproximadamente el 80% de pureza, al menos aproximadamente el 90% de pureza, al menos aproximadamente el 95% de pureza, superior al 95% de pureza, o superior al 99% de pureza. Una forma para
10 mostrar que una preparación de proteína particular contiene un polipéptido aislado es por la aparición de una única banda tras la electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida de la preparación de proteína y tinción con Coomassie Brilliant Blue del gel. Sin embargo, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas tales como dímeros o formas alternativamente glicosiladas o derivatizadas.

15 Los términos “extremo amino” y “extremo carboxilo” se usan en este documento para denotar posiciones dentro de polipéptidos. Si el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia particular o porción de un polipéptido para denotar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia posicionada en el extremo carboxilo con respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está localiza proximal al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

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

El término “variante de corte y empalme” se usa en este documento para denotar formas alternativas de ARN transcritas de un gen. La variación de corte y empalme se produce naturalmente mediante el uso de sitios de corte y empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita, o menos comúnmente entre moléculas de ARN transcritas por separado, y puede producir varios ARNm transcritos del mismo gen. Las variantes de corte y empalme pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. El término variante de corte y empalme también se usa en este documento para denotar un polipéptido codificado por una variante de corte y empalme de un ARNm transcrito de un gen.
25

30 Como se usa en este documento, el término “inmunomodulador” incluye citocinas, factores de crecimiento de citoblastos, linfotoxinas, moléculas co-estimuladoras, factores hematopoyéticos y análogos sintéticos de estas moléculas.

El término “par de complemento/anticomplemento” denota restos no idénticos que forman un par estable no covalentemente asociado bajo condiciones apropiadas. Por ejemplo, biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de una par de complemento/anticomplemento. Otros pares de complemento/anticomplemento a modo de ejemplo incluyen pares de receptor/ligando, pares de anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos sentido/antisentido y similares. Si se desea la posterior disociación del par de complemento/anticomplemento, el par de complemento/anticomplemento tiene preferentemente una afinidad de unión inferior a 10^9 M^{-1} .
35

40 Un “fragmento de anticuerpo” es una parte de un anticuerpo tal como $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une al mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

El término “fragmento de anticuerpo” también incluye un polipéptido sintético o uno genéticamente manipulado que se une a un antígeno específico tal como polipéptidos que consisten en la región variable de la cadena ligera, fragmentos “Fv” que consisten en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, moléculas de polipéptido monocatenarias recombinantes en las que las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un ligador de péptidos (“proteínas de scFv”) y unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable.
45

Un “anticuerpo quimérico” es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las regiones determinantes de la complementariedad derivados de un anticuerpo de roedor, mientras que el resto de la molécula de anticuerpo se deriva de un anticuerpo humano.
50

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

55 Como se usa en este documento, un “agente terapéutico” es una molécula o átomo que está conjugado con un resto de anticuerpo para producir un conjugado, que es útil para terapia. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes, y

radioisótopos.

Una "marca detectable" es una molécula o átomo que puede conjugarse con un resto de anticuerpo para producir una molécula útil para diagnóstico. Ejemplos de marcas detectables incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos u otros restos marcadores.

5 El término "marca de afinidad" se usa en este documento para denotar un segmento de polipéptido que puede unirse a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, como marca de afinidad puede usarse cualquier péptido o proteína para el que un anticuerpo u otro agente de unión específica esté disponible. Las marcas de afinidad incluyen una extensión de polihistidina, proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4: 1075 (1985); Nilsson y col.,
10 Methods Enzymol. 198:3 (1991)), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31 (1988)), marca de afinidad por Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp y col., Biotechnology 6:1204 (1988)), péptido de unión a estreptavidina u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford y col., Protein Expression and Purification 2:95 (1991). Las moléculas de ADN que codifican marcas de afinidad están disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway,
15 NJ).

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

20 Como se usa en este documento, el término "componente de anticuerpo" incluye tanto un anticuerpo completo como un fragmento de anticuerpo.

Un "inmunoconjugado" es un conjugado de un componente de anticuerpo con un agente terapéutico o una marca detectable.

25 Un "polipéptido diana" o un "péptido diana" es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un epítipo y que se expresa sobre una célula diana tal como una célula tumoral, o una célula que lleva un antígeno de agente infeccioso. Los linfocitos T reconocen epítopes de péptidos presentados por una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor a un polipéptido diana o péptido diana y normalmente lisan la célula diana o reclutan otras células inmunitarias al sitio de la célula diana, destruyendo así la célula diana.

30 Un "péptido antigénico" es un péptido que se unirá a una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor para formar un complejo de MHC-péptido que es reconocido por un linfocito T, induciéndose así una respuesta de linfocitos citotóxicos tras la presentación al linfocito T. Por tanto, los péptidos antigénicos pueden unirse a una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor apropiada e inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos tal como lisis de células o liberación de citocinas específicas contra la célula diana, que se une a o expresa el antígeno. El péptido antigénico puede unirse en el contexto de una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor de clase I o clase II sobre una célula presentadora de antígeno o sobre una célula diana.

35 En eucariotas, la ARN polimerasa II cataliza la transcripción de un gen estructural para producir ARNm. Una molécula de ácido nucleico puede diseñarse para contener un molde de ARN polimerasa II en el que el transcrito de ARN tiene una secuencia que es complementaria a la de un ARNm específico. El transcrito de ARN se llama un "ARN antisentido" y una molécula de ácido nucleico que codifica el ARN antisentido se llama un "gen antisentido". Las moléculas de ARN antisentido pueden unirse a moléculas de ARNm, produciendo una inhibición de la traducción de ARNm.
40

Debido a la imprecisión de los procedimientos analíticos convencionales, se entiende que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros son valores aproximados. Cuando un valor de este tipo se expresa como "aproximadamente" X, el valor establecido de X se entenderá que es preciso $\pm 10\%$.

3. Producción de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de TACI-inmunoglobulina

45 La Figura 1 proporciona la secuencia de aminoácidos predicha de TACI humano (von Bülow y Bram, Science 278:138 (1997)). El polipéptido de TACI contiene los siguientes elementos predichos: (a) dos estructuras de pseudo-repetición ricas en cisteína características de dominios de unión al ligando del factor de necrosis tumoral, (b) una "región del tallo" de 62 aminoácidos que reside entre los dominios de unión a ligando y el dominio transmembrana, (c) un dominio transmembrana de 20 aminoácidos y (d) un dominio intracelular de 127 aminoácidos. La secuencia
50 de aminoácidos no contiene una secuencia señal del extremo amino hidrófoba predicha.

Con el fin de crear una forma soluble de TACI humano para su uso como un inhibidor de la interacción de ligando nativo:receptor nativo se generó una proteína de fusión de dominio extracelular de TACI - Fc de inmunoglobulina humana. La secuencia de TACI humano disponible se usó como punto de partida para diseñar la molécula de la proteína de fusión (von Bülow y Bram, Science 278:138 (1997)). Esta construcción inicial, designada "TACI-Fc4",
55 incluyó los residuos de aminoácidos 1 a 154 del polipéptido de TACI y una región de Fc humana modificada, descrita más adelante. Se eligió el punto de fusión del residuo 154 con el fin de incluir tanto de la región del tallo de TACI

El fragmento Fc, o dominio Fc, consiste en las regiones bisagra de la cadena pesada unidas por disulfuro, los dominios C_{H2} y C_{H3}. En proteínas de fusión de inmunoglobulina, los dominios Fc de la subclase IgG1 se usan frecuentemente como resto de inmunoglobulina, debido a que IgG1 tiene la mayor semivida en suero de cualquiera de las proteínas del suero. La larga semivida en suero puede ser una característica deseable para estudios animales y posible uso terapéutico humano. Además, la subclase IgG1 posee la capacidad más fuerte para llevar a cabo funciones efectoras mediadas por anticuerpos. La función efectora primaria que puede ser más útil en una proteína de fusión de inmunoglobulina es la capacidad de un anticuerpo IgG1 para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Por otra parte, esto podría ser una función no deseable para una proteína de fusión que funciona principalmente como un antagonista. Se han identificado varios de los residuos de aminoácidos específicos que son importantes para la actividad mediada por la región constante del anticuerpo en la subclase IgG1. Por tanto, la inclusión o exclusión de estos aminoácidos específicos permite la inclusión o exclusión de actividad mediada por región constante de inmunoglobulina específica.

Se generaron seis versiones de un Fc de IgG1 humana modificado para crear proteínas de fusión de Fc. Se diseñó Fc-488 para la clonación conveniente de una proteína de fusión que contiene la región Fc de $\gamma 1$ humana, y se construyó usando la región constante $\gamma 1$ de inmunoglobulina humana natural como molde. La preocupación por los posibles efectos perjudiciales debidos a un residuo de cisteína sin aparear condujeron a la decisión de sustituir la cisteína (residuo de aminoácido 24 de SEC ID N°: 6) que normalmente se liga por disulfuro con la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina con un residuo de serina. Se introdujo otro cambio en el codón que codifica la posición de índice EU 218 (residuo de aminoácido 22 de SEC ID N°: 6) para introducir un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Bgl*II para facilitar futuras manipulaciones de ADN. Estos cambios se introdujeron en el producto de PCR codificado por los cebadores de PCR. Debido a la localización del sitio *Bgl*II y con el fin de completar la región bisagra Fc, los codones para las posiciones de índice EU 216 y 217 (residuos de aminoácidos 20 y 21 de SEC ID N°: 6) se incorporaron en las secuencias de los componentes de la proteína de fusión.

Fc4, Fc5, y Fc6 contienen mutaciones para reducir funciones efectoras mediadas por Fc reduciendo la unión a Fc γ RI y la unión a C1q del complemento. Fc4 contiene las mismas sustituciones de aminoácidos que se introdujeron en Fc-488. Se introdujeron otras sustituciones de aminoácidos para reducir las posibles funciones efectoras mediadas por Fc. Específicamente, se introdujeron tres sustituciones de aminoácidos para reducir la unión a Fc γ RI. Éstas son las sustituciones en las posiciones de índice EU 234, 235 y 237 (residuos de aminoácidos 38, 39 y 41 de SEC ID N°: 6). Se ha mostrado que las sustituciones en estas posiciones reducen la unión a Fc γ RI (Duncan y col., Nature 332:563 (1988)). Estas sustituciones de aminoácidos pueden también reducir la unión a Fc γ RIIIa, además de la unión a Fc γ RIII (Sondermann y col., Nature 406:267 (2000); Wines y col., J. Immunol. 164:5313 (2000)).

Varios grupos han descrito la relevancia de las posiciones de índice EU 330 y 331 (residuos de aminoácidos 134 y 135 de SEC ID N°: 6) en la unión a C1q del complemento y posterior fijación del complemento (Canfield y Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991); Tao y col., J. Exp. Med. 178:661 (1993)). Las sustituciones de aminoácidos en estas posiciones se introdujeron en Fc4 para reducir la fijación del complemento. El dominio C_{H3} de Fc4 es idéntico al encontrado en el polipéptido natural correspondiente, excepto por el codón de terminación, que se cambió de TOA a TAA para eliminar un posible sitio de metilación *dam* cuando el ADN clonado se cultiva en *dam* más cepas de *E. coli*.

En Fc5, el residuo de arginina en la posición del índice EU 218 se mutó de nuevo a lisina debido a que el esquema de clonación de *Bgl*II no se usó en proteínas de fusión que contenían este Fc particular. El resto de la secuencia de Fc5 coincide con la descripción anterior para Fc4.

Fc6 es idéntico a Fc5, excepto en que se ha eliminado el codón de lisina del extremo carboxilo. La lisina del extremo C de inmunoglobulinas maduras se elimina frecuentemente de las inmunoglobulinas maduras después de la traducción antes de la secreción de linfocitos B, o se elimina durante la circulación en suero. Por consiguiente, el residuo de lisina del extremo C normalmente no se encuentra en los anticuerpos en circulación. Como en Fc4 y Fc5 anteriormente, el codón de terminación en la secuencia de Fc6 se cambió a TAA.

Fc7 es idéntico a $\gamma 1$ de Fc natural, excepto por una sustitución de aminoácidos en la posición del índice EU 297 localizada en el dominio C_{H2}. La posición del índice EU Asn-297 (residuo de aminoácido 101 de SEC ID N°: 6) es un sitio de unión de hidrato de carbono ligado a N. El hidrato de carbono ligado a N que introduce una posible fuente de variabilidad en una proteína recombinantemente expresada debido a posibles variaciones de lote a lote en la estructura del hidrato de carbono. En un intento por eliminar esta posible variabilidad, Asn-297 se mutó a un residuo de glutamina para evitar la unión del hidrato de carbono ligado a N en esa posición de residuo. El hidrato de carbono en el residuo 297 también participa en la unión de Fc a Fc γ RIII (Sondermann y col., Nature 406:267 (2000)). Por tanto, la eliminación del hidrato de carbono no debe disminuir la unión de Fc7 recombinante que contiene proteínas de fusión con Fc γ R en general. Como antes, el codón de terminación en la secuencia de Fc7 se mutó a TAA.

Fc8 es idéntico a la región $\gamma 1$ de la inmunoglobulina natural mostrada en SEC ID N°: 6, excepto que el residuo de cisteína en la posición del índice EU 220 (residuo de aminoácido 24 de SEC ID N°: 6) se sustituyó con un residuo de serina. Esta mutación eliminó el residuo de cisteína que normalmente se liga por disulfuro con la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina.

En la Tabla 1 se describen construcciones de TACI-Fc ilustrativas.

Tabla 1

Construcciones de proteínas de fusión de TACI-Fc ilustrativas	
Secuencia de TACI ^a	Versión de Fc
TACI ^b	Fc4
TACI ^b	Fc5
TACI ^b	Fc _γ 1
TACI (d107-154)	Fc5
TACI (R119Q)	Fc4
TACI (1-104)-BCMA (42-54) ^c	Fc5
TACI (d143-150)	Fc5
TACI (R142G, d143-150)	Fc5
TACI (R119G, Q121P, R122Q, S123A)	Fc5
TACI(R119G, R122Q)	Fc5
TACI (d1-28, V29M)	Fc6
TACI (d1-29)	Fc6
TACI (d1-29)	Fc5
TACI (d1-29, d107-154)	Fc5
TACI (d1-29, d111-154)	Fc5
TACI (d1-29, d120-154)	Fc5
^a Se proporciona información sobre localizaciones, mutaciones y deleciones de secuencias de aminoácidos entre paréntesis en referencia a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2. ^b Incluye los residuos de aminoácidos 1 a 154 de SEC ID N°: 2. ^c Esta construcción incluye los residuos de aminoácidos 1 a 104 de SEC ID N°: 2 (TACI) y los aminoácidos 42 a 54 de SEC ID N°: 27 (BCMA).	

5 Las proteínas de TACI-Fc se produjeron por células de ovario de hámster chino recombinantes, se aislaron y se analizaron usando análisis de transferencia Western y análisis de secuencias de aminoácidos. Sorprendentemente, la deleción de los 29 primeros aminoácidos del extremo N del polipéptido de TACI produjo un aumento de diez veces en la producción de proteínas de fusión de TACI-Fc por células de ovario de hámster chino. Esta deleción también redujo la escisión de la región del tallo de longitud completa. Además, la escisión dentro de la región del tallo de TACI se suprimió tanto por truncación de la región del tallo de TACI como por sustitución de la región del tallo de TACI dentro de otra secuencia de aminoácidos (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la región del tallo de BCMA).

10 Como se describe en el Ejemplo 4, los análisis funcionales de construcciones de TACI-Fc indican que las proteínas de fusión TACI (d1-29)-Fc5, TACI (d1-29, d107-154)-Fc5, TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 y TACI (d1-29, d120,154)-Fc5 tienen afinidades de unión similares por ZTNF4. Sin embargo, las construcciones TACI (d1-29)-Fc5, TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 y TACI (d1-29, d120-154)-Fc5 parecen unirse más a ZTNF4 por mol de TACI-Fc que la construcción TACI (d1-29, d107-154)-Fc5. Dependiendo del uso previsto (es decir, terapéutico, diagnóstico o investigación), pueden emplearse tanto proteínas de fusión TACI-Fc de alta capacidad como de baja capacidad. Además, una combinación de proteínas de fusión TACI-Fc de alta capacidad y de baja capacidad permite la valoración de ZTNF2 o ZTNF4.

La presente invención contempla proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina que comprenden un resto del

receptor de TACI que consiste en los residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2, o 30 a 154 de SEC ID N°: 2. La presente memoria descriptiva también describe proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina que comprenden un resto del receptor de TACI que consiste en los residuos de aminoácidos 31 a 106 de SEC ID N°: 2, 31 a 110 de SEC ID N°: 2, 31 a 119 de SEC ID N°: 2, o 31 a 154 de SEC ID N°: 2.

- 5 Más generalmente, la presente invención incluye proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina en las que el resto del receptor de TACI consiste en un fragmento de residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 21 como se define en las reivindicaciones y en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4. Tales fragmentos comprenden una región de pseudo-repeticiones rica en cisteína, y opcionalmente pueden incluir al menos uno de un segmento del extremo N que reside en una posición del extremo amino con respecto a la región de pseudo-repeticiones rica en cisteína y un segmento del tallo que reside en una posición el extremo carboxilo con respecto a la región de pseudo-repeticiones rica en cisteína. Regiones de pseudo-repeticiones ricas en cisteína adecuadas incluyen polipéptidos que: (a) comprenden al menos uno de los residuos de aminoácidos 34 a 66 de SEC ID N°: 2 y los residuos de aminoácidos 71 a 104 de SEC ID N°: 2, (b) comprenden ambos residuos de aminoácidos 34 a 66 de SEC ID N°: 2 y los residuos de aminoácidos 71 a 104 de SEC ID N°: 2, o (c) comprenden los residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2.

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

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

Más generalmente, un segmento del tallo puede consistir en dos a 50 residuos de aminoácidos.

- 45 El resto de inmunoglobulina de una proteína de fusión descrita en este documento comprende al menos una región constante de una inmunoglobulina. Preferentemente, el resto de inmunoglobulina representa un segmento de una inmunoglobulina humana. La secuencia de inmunoglobulina humana puede ser una secuencia de aminoácidos natural, o una secuencia de aminoácidos natural modificada que tiene al menos una de las mutaciones de aminoácidos tratadas anteriormente.

- 50 La secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina humana también puede variar de la natural teniendo una o más mutaciones características de un determinante alotípico conocido. La Tabla 2 muestra los determinantes alotípicos de la región constante de IgG_γ1 humana (Putman, The Plasma Proteins, vol. V, páginas 49 a 140 (Academic Press, Inc. 1987)). Las posiciones de índice EU 214, 356, 358 y 431 definen los alotipos de IgG_γ1 conocidos. La posición 214 está en el dominio C_{H1} de la región constante de IgC_γ1 y, por tanto, no reside dentro de la secuencia de Fc. La secuencia de Fc natural de SEC ID N°: 6 incluye los alotipos Glm (1) y Glm(2-). Sin embargo, el resto de Fc de una proteína de TACI-Fc puede modificarse para reflejar cualquier combinación de estos alotipos.

Tabla 2

Determinantes alotípico de la región constante $\gamma 1$ de inmunoglobulina humana			
Alotipo	Residuo de aminoácido	Posición de aminoácido	
		Índice EU	SEC ID N°: 6
Glm(1)	Asp, Leu	356, 358	160,162
Glm(1-)	Glu, Met	356, 358	150, 162
Glm(2)	Gly	431	235
Glm(2-)	Ala	431	235
Glm(3)	Arg	214	-
Glm(3-)	Lys	214	-

- Los ejemplos de proteína de TACI-Fc desvelada en este documento comprenden regiones constantes de IgG1 humana. Sin embargo, restos de inmunoglobulina adecuados también incluyen polipéptidos que comprenden al menos una región constante tal como una región constante de la cadena pesada de cualquiera de las siguientes inmunoglobulinas: IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE y IgM. Ventajosamente, restos de inmunoglobulina derivados de IgG2 natural o IgG4 natural ofrecen función efectora reducida en comparación con IgG1 natural o IgG3 natural. La presente memoria descriptiva describe proteínas de fusión que comprenden un resto del receptor de TACI, como se ha descrito anteriormente, y tanto albúmina como $\beta 2$ -macroglobulina.
- Otro tipo de proteína de fusión de receptor que se une a ZTNF2 o ZTNF4 es una proteína de fusión de BCMA-inmunoglobulina. Se han realizado estudios con una proteína de fusión de BCMA-Fc4 en la que el resto de BCMA consiste en los residuos de aminoácidos 1 a 48 de SEC ID N°: 27. Sorprendentemente, estudios farmacocinéticos en ratones revelaron que la proteína de fusión de BCMA-Fc4 tenía una semivida de aproximadamente 101 horas, mientras que una proteína de TACI-Fc tenía una semivida de 25 horas. Por tanto, la administración de una proteína de fusión de BCMA-inmunoglobulina puede preferirse en cierta práctica clínica. Además, una combinación de proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina y de BCMA-inmunoglobulina puede ser ventajosa para tratar ciertas afecciones. Esta terapia de combinación puede lograrse administrando proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina y BCMA-inmunoglobulina, o administrando heterodímeros de proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina y de BCMA-inmunoglobulina.
- Otro tipo de proteína de fusión de receptor que se une a ZTNF4 es una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende un dominio extracelular de un receptor designado "Ztnfr12". Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de Ztnfr12 se proporcionan como SEC ID N°: 59 y SEC ID N°: 60, respectivamente. Restos del receptor de Ztnfr12 adecuados incluyen polipéptidos que comprenden los residuos de aminoácidos 1 a 69 de SEC ID N°: 60, o residuos de aminoácidos 19 a 35 de SEC ID N°: 60.
- Las proteínas de fusión de la presente invención pueden tener la forma de polipéptidos monocatenarios, dímeros, trímeros o múltiples dímeros o trímeros. Los dímeros pueden ser homodímeros o heterodímeros, y los trímeros pueden ser homotrímeros o heterotrímeros. Ejemplos de heterodímeros incluyen un polipéptido de TACI-inmunoglobulina con un polipéptido de BCMA-inmunoglobulina, un polipéptido de TACI-inmunoglobulina con un polipéptido de Ztnfr12-inmunoglobulina, y un polipéptido de BCMA-inmunoglobulina con un polipéptido de Ztnfr12-inmunoglobulina. Ejemplos de heterotrímeros incluyen un polipéptido de TACI-inmunoglobulina con dos polipéptidos de BCMA-inmunoglobulina, un polipéptido de TACI-inmunoglobulina con dos polipéptidos de Ztnfr12-inmunoglobulina, un polipéptido BCMA-inmunoglobulina con dos polipéptidos de Ztnfr12-inmunoglobulina, dos polipéptidos de TACI-inmunoglobulina con un polipéptido BCMA-inmunoglobulina, dos polipéptidos de TACI-inmunoglobulina con un polipéptido Ztnfr12-inmunoglobulina, dos polipéptidos de BCMA-inmunoglobulina con un polipéptido de Ztnfr12-inmunoglobulina y un trímero de un polipéptido de TACI-inmunoglobulina, un polipéptido de BCMA-inmunoglobulina y un polipéptido de Ztnfr12-inmunoglobulina.
- En tales proteínas de fusión, el resto del receptor de TACI puede comprender al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 2: residuos de aminoácidos 30 a 154, residuos de aminoácidos 34 a 66, residuos de aminoácidos 71 a 104, residuos de aminoácidos 47 a 62 y residuos de aminoácidos 86 a 100. El resto de receptor de BCMA puede comprender al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 27: residuos de aminoácidos 1 a 48, residuos de aminoácidos 8 a 41 y residuos de aminoácidos 21 a 37. El resto de receptor de Ztnfr12 puede comprender al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 60: residuos de aminoácidos 1 a 69 y residuos de aminoácidos 19 a 35.

Las proteínas de fusión pueden producirse usando los procedimientos de PCR usados para la construcción de las moléculas de TACI-Fc ilustrativas que se describen en los ejemplos. Sin embargo, aquellos expertos en la materia pueden usar otros enfoques convencionales. Por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de TACI, BCMA, Ztnfr12 o inmunoglobulina pueden obtenerse cribando ADNc humano o bibliotecas genómicas usando sondas de polinucleótidos basadas en secuencias desveladas en este documento. Estas técnicas son convencionales y están bien establecidas (véase, por ejemplo, Ausubel y col. (eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª edición, páginas 4-1 a 4-6 (John Wiley & Sons 1995) ("Ausubel (1995)"); Wu y col., *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 33-41 (CRC Press, Inc. 1997) ("Wu (1997)"); Ausubel (1995) en las páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) en las páginas 307-327)).

Alternativamente, las moléculas para construir proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden obtenerse sintetizando moléculas de ácido nucleico usando oligonucleótidos largos de cebado mutuo y las secuencias de nucleótidos descritas en este documento (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 8-8 a 8-9). Las técnicas establecidas usando la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad para sintetizar moléculas de ADN de al menos dos kilobases de longitud (Adang y col., *Plant Molec. Biol.* 21:1131 (1993), Bambot y col., *PCR Methods and Applications* 2:266 (1993), Dillon y col., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", en *Methods in Molecular Biology*, vol. 15: *PCR Protocols: Current Methods and Applications*, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc. 1993) y Holowachuk y col., *PCR Methods Appl* 4:299 (1995)).

Las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento también pueden sintetizarse con "máquinas de genes" usando protocolos tales como el procedimiento de fosforamido. Si se requiere ADN bicatenario sintetizado químicamente para una aplicación tal como la síntesis de un gen o un fragmento de gen, entonces cada hebra complementaria se prepara por separado. La producción de genes cortos (60 a 80 pares de bases) es técnicamente sencilla y puede llevarse a cabo sintetizando las hebras complementarias y luego hibridándolas. Sin embargo, para la producción de genes más largos (>300 pares de bases), pueden requerirse estrategias especiales debido a que la eficiencia de acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis de ADN química es raramente el 100%. Para vencer este problema, los genes sintéticos (bicatenarios) se ensamblan en forma modular a partir de fragmentos monocatenarios que tienen de 20 a 100 nucleótidos de longitud. Para revisiones sobre la síntesis de polinucleótidos véase, por ejemplo, Glick y Pastarnak, *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press 1994), Itakura y col., *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984), y Climie y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:633 (1990).

4. Producción de polipéptidos de TACI-inmunoglobulina

Los polipéptidos de la presente invención pueden producirse en células huésped recombinantes siguiendo las técnicas convencionales. Para expresar una secuencia codificante de TACI-inmunoglobulina, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido debe estar operativamente ligada a secuencias reguladoras que controlan la expresión transcripcional en un vector de expresión y luego introducirse en una célula huésped. Además de las secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores y potenciadores, los vectores de expresión puede incluir secuencias reguladoras de la traducción y un gen marcador que sea adecuado para la selección de células que llevan el vector de expresión.

Vectores de expresión que son adecuados para la producción de una proteína extraña en células eucariotas normalmente contienen (1) elementos de ADN procarionta que codifican un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a antibióticos para proporcionar el crecimiento y la selección del vector de expresión en un huésped bacteriano; (2) elementos de ADN eucariota que controlan la iniciación de la transcripción tal como un promotor; y (3) elementos de ADN que controlan el procesamiento de transcritos, tales como una secuencia de terminación/poliadenilación de la transcripción.

Los vectores de expresión también pueden incluir secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia secretora que dirige el polipéptido heterólogo a la ruta secretora de una célula huésped. Por ejemplo, un vector de expresión puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica TACI-inmunoglobulina y una secuencia secretora derivada de cualquier gen secretado. Como se ha tratado anteriormente, una secuencia señal adecuada es una secuencia señal de tPA. Una secuencia señal de tPA a modo de ejemplo se proporciona por SEC ID N°: 25. Otra secuencia señal adecuada es una secuencia señal de 26-10 V_H murina. El anticuerpo 26-10 murino se describe, por ejemplo, por Near y col., *Mol. Immunol.* 27:901 (1990). Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos ilustrativos de una secuencia señal de 26-10 V_H murina se proporcionan por SEC ID N°: 61 y SEC ID N°: 65, respectivamente. SEC ID N°: 62 desvela la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de TACI-Fc5 que comprende una secuencia señal de 26-10 V_H murina.

Las proteínas de TACI-inmunoglobulina de la presente invención pueden expresarse en células de mamífero. Ejemplos de células huésped adecuadas de mamífero incluyen células de riñón de mono verde africano (Vero; ATCC CRL 1587), células renales embrionarias humanas (293-HEK; ATCC CRL 1573), células de riñón de hámster bebé (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células de riñón canino (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin y col., *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555, 1986)), células pituitarias de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de

hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548) células de riñón de mono transformadas por SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

5 Para un huésped mamífero, las señales reguladoras de la transcripción y la traducción pueden derivarse de fuentes víricas tales como adenovirus, virus del papiloma bovino, virus simio o similares, en las que las señales reguladoras están asociadas a un gen particular que tiene un alto nivel de expresión. Las señales reguladoras de la transcripción y la traducción adecuadas también pueden obtenerse de genes de mamífero tales como genes de actina, colágeno, miosina y metalotioneína.

10 Las señales reguladoras de la transcripción incluyen una región promotora suficiente para dirigir la iniciación de la síntesis de ARN. Promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor del gen de la *metalotioneína I* de ratón (Hamer y col., J. Molec. Appl. Genet. 1:273 (1982)), el promotor *TK* del *virus del herpes* (McKnight, Cell 31:355 (1982)), el promotor temprano del *SV40* (Benoist y col., Nature 290:304 (1981)), el promotor del virus del sarcoma de *Rous* (Gorman y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 79:6777 (1982)), el promotor del citomegalovirus (Foecking y col., Gene 45:101 (1980)) y el promotor del virus de tumor de mama de ratón (véase, generalmente, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland y col. (eds.), páginas 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)). Una combinación útil de un promotor y potenciador se proporciona por un promotor del virus del sarcoma mieloproliferativo y un potenciador del citomegalovirus humano.

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

25 Un vector de expresión puede introducirse en células huésped usando una variedad de técnicas convencionales que incluyen transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por liposomas, administración mediada por microproyectiles, electroporación y similares. Las células transfectadas pueden seleccionarse y propagarse para proporcionar células huésped recombinantes que comprenden el vector de expresión establemente integrado en el genoma de la célula huésped. Técnicas para introducir vectores en células eucariotas y técnicas para seleccionar tales transformantes estables usando un marcador de selección dominante se describen, por ejemplo, por Ausubel (1995) y por Murray (ed.), Gene Transfer and Expression Protocols (Humana Press 1991).

30 Por ejemplo, un marcador de selección adecuado es un gen que proporciona resistencia al antibiótico neomicina. En este caso, la selección se lleva a cabo en presencia de un fármaco de tipo neomicina tal como G-418 o similares. Los sistemas de selección también pueden usarse para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un procedimiento denominado en lo sucesivo "amplificación". La amplificación se lleva a cabo cultivando transfectantes en presencia de un bajo nivel de agente selectivo de colorante y luego aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que producen altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador de selección amplificable adecuado es la dihidrofolato-reductasa, que confiere resistencia a metotrexato. También pueden usarse otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puromicina-acetiltransferasa). Alternativamente, los marcadores que introducen un fenotipo alterado tal como proteína verde fluorescente, o proteínas de la superficie celular tales como CD4, CD8, MHC de clase I, fosfatasa alcalina placentaria, pueden usarse para clasificar células transfectadas de células no transfectadas por medios tales como clasificación por FACS o tecnología de separación por perlas magnéticas.

45 Los polipéptidos de TACI-inmunoglobulina también pueden producirse por células de mamífero cultivadas usando un sistema de administración vírico. Virus a modo de ejemplo para este fin incluyen adenovirus, virus del herpes, virus de la variolovacuna y virus adenoasociados (AAV). El adenovirus, un virus de ADN bicatenario, es actualmente el vector de transferencia de genes mejor estudiado para la administración de ácido nucleico heterólogo (para una revisión véanse Becker y col., Meth. Cell Biol. 43:161 (1994), y Douglas y Curiel, Science & Medicine 4:44 (1997)). Las ventajas del sistema de adenovirus incluyen la acomodación de insertos de ADN relativamente grandes, la capacidad de cultivar a alto título, la capacidad para infectar una amplia gama de tipos de células de mamífero y la flexibilidad que permite usar un gran número de vectores disponibles que contienen diferentes promotores.

50 Delecionando porciones del genoma del adenovirus pueden acomodarse insertos más grandes (hasta 7 kb) de ADN heterólogo. Estos insertos pueden incorporarse en el ADN vírico por ligación directa o por recombinación homóloga con un plásmido co-transfectado. Una opción es delecionar el gen *E1* esencial del vector vírico, que produce la incapacidad de replicar a menos que el gen *E1* se proporcione por la célula huésped. Las células 293 humanas infectadas por el vector de adenovirus (nº de ATCC CRL-1573, 45504, 45505), por ejemplo, pueden cultivarse como células adherentes o en cultivo en suspensión a densidad de células relativamente alta para producir cantidades significativas de proteína (véase Garnier y col., Cytotechnol. 15:145 (1994)).

Los expertos en la materia pueden idear vectores de expresión adecuados para producir las proteínas de fusión descritas en este documento con células de mamífero. El Ejemplo 4 describe características de un vector de expresión. Como otro ejemplo, un vector de expresión puede comprender un casete de expresión bicistrónico que incluye una parte del potenciador del citomegalovirus humano, el promotor del virus del sarcoma mieloproliferativo,

una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión, los sitios de entrada ribosómica interna del poliovirus, una secuencia de nucleótidos que codifica la dihidrofolato-reductasa murina, seguido de la secuencia de adición de poli-A a SV40. La secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 69 muestra una construcción del potenciador del citomegalovirus/promotor LTR del virus del sarcoma mieloproliferativo en la que el potenciador del citomegalovirus se extiende del nucleótido 1 a 407. El promotor LTR del virus del sarcoma mieloproliferativo, ausente la región de control negativo, se extiende del nucleótido 408 al nucleótido 884 de SEC ID N°: 69. Una secuencia de nucleótidos para el promotor LTR del virus del sarcoma mieloproliferativo sin la región de control negativo se proporciona en SEC ID N°: 70.

El Ejemplo 1 describe un vector de expresión que comprende un promotor del citomegalovirus para dirigir la expresión del transgén de la proteína recombinante, un intrón de inmunoglobulina y una secuencia señal del activador tisular del plasminógeno. Un intrón de inmunoglobulina adecuado es un intrón 26-10 V_H murino. SEC ID N°: 66 proporciona una secuencia de nucleótidos ilustrativa de un intrón 26-10 V_H murino. Un vector de expresión también puede incluir una región sin traducir en 5' (UTR) localizada en la dirección 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de TACI-inmunoglobulina. Una 5'-UTR adecuada puede derivarse del gen de 26-10 V_H murino. SEC ID N°: 63 desvela la secuencia de nucleótidos de una 5'-UTR de 26-10 V_H murina nativa útil, mientras que SEC ID N°: 64 muestra la secuencia de nucleótidos de una 5'-UTR de 26-10 V_H murina que se ha optimizado en el extremo 3'.

Como ilustración, SEC ID N°: 67 proporciona una secuencia de nucleótidos que incluye los siguientes elementos: una 5'-UTR de 26-10 V_H murina nativa (nucleótidos 1 a 51), una secuencia señal de 26-10 V_H murina (nucleótidos 52 a 97, y 182 a 192), un intrón de 26-10 V_H murino (nucleótidos 98 a 181), una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de TACI (nucleótidos 193 a 435) y una secuencia de nucleótidos que codifica un resto Fc5 (nucleótidos 436 a 1131). La secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 68 se diferencia de SEC ID N°: 67 debido a la sustitución de la secuencia nativa con una 5'-UTR de 26-10 V_H murina optimizada (nucleótidos 1 a 51).

Las proteínas de TACI-inmunoglobulina también pueden expresarse en otras células eucariotas superiores tales como células aviarias, fúngicas, de insecto, de levadura o vegetales. El sistema de baculovirus proporciona un medio eficiente para introducir genes clonados en células de insecto. Vectores de expresión adecuados se basan en el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (Ac-MNPV), y contienen promotores muy conocidos tales como el promotor 70 de la *proteína de choque térmico (hsp)* de *Drosophila*, el promotor del gen temprano inmediato del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica (ie-1)* y el promotor *39K temprano retardado*, promotor *p10* del baculovirus y el promotor de la *metalotioneína* de *Drosophila*. Un segundo procedimiento de preparación de baculovirus recombinantes utiliza un sistema basado en transposones descrito por Luckow (Luckow y col., J. Virol. 67:4566 (1993)). Este sistema, que utiliza vectores de transferencia, se comercializa en el kit BAC-to-BAC (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, PFASTBAC (Life Technologies) que contiene un transposón Tn7 para mover el ADN que codifica el polipéptido de TACI-inmunoglobulina en un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande llamado un "bácmido". Véase Hill-Perkins y Possee, J. Gen. Virol. 71:971 (1990), Bonning y col., J. Gen. Virol. 75:1551 (1994), y Chazenbalk, y Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543 (1995). Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en marco con ADN que codifica una marca de epítipo en el extremo C o N del polipéptido de TACI-inmunoglobulina expresado, por ejemplo, una marca de epítipo Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. 82:7952 (1985)). Usando una técnica conocida en la técnica, un vector de transferencia que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de TACI-inmunoglobulina se transforma en *E. coli*, y se criba para bácmidos, que contienen un gen *lacZ* interrumpido indicativo de baculovirus recombinante. El ADN de bácmido que contiene el genoma del baculovirus recombinante se aísla luego usando técnicas comunes.

El vector PFASTBAC ilustrativo puede modificarse a un grado considerable. Por ejemplo, el vector de la poliedrina puede eliminarse y sustituirse con el promotor de la proteína básica del baculovirus (también conocida como promotor de Pcor, p6.9 o MP) que se expresa tempranamente en la infección por baculovirus, y se ha mostrado que es ventajosa para expresar proteínas secretadas (véase, por ejemplo, Hill-Perkins y Possee, J. Gen. Virol. 71:971 (1990), Bonning y col., J. Gen. Virol. 75:1551 (1994), y Chazenbalk y Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543 (1995)). En tales construcciones de vectores de transferencia puede usarse una versión corta o larga del promotor de la proteína básica. Además, pueden construirse vectores de transferencia con secuencias señal secretoras derivadas de proteínas de insecto. Por ejemplo, en tales construcciones puede usarse una secuencia señal secretora de ecdisteroide-glicosiltransferasa (EGT), melitina de la abeja mielera (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA) o baculovirus gp67 (PharMingen; San Diego, CA).

El virus o bácmido recombinante se usa para transfectar células huésped. Células huésped de insecto adecuadas incluyen líneas celulares derivadas de IPLB-Sf21, una línea celular de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda* tal como Sf9 (ATCC CRL 1711), Sf21AE y Sf21 (Invitrogen Corporation; San Diego, CA), además de células Schneider-2 de *Drosophila*, y la línea celular HIGH FIVEO (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (patente de EE.UU. n° 5.300.435). Pueden usarse medios libres de suero comercialmente disponibles para cultivar y para mantener las células. Medios adecuados son Sf900 II™ (Life Technologies) o ESF 921™ (Expression Systems) para las células Sf9; y Ex-cello405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveO™ (Life Technologies) para las células de *T. ni*. Si se usa virus recombinante, las células se cultivan normalmente a partir de una densidad de inoculación de aproximadamente 2-5 x 10⁵ células a una densidad de 1-2 x 10⁶ células en el momento en el que se

añade una cepa vírica recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 a 10, más normalmente próxima a 3.

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

También pueden usarse células fúngicas, que incluyen células de levadura, para expresar los genes descritos en este documento. Especies de levadura de particular interés a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Promotores adecuados para la expresión en levadura incluyen promotores de *GAL1* (galactosa), *PGK* (fosfoglicerato-cinasa), *ADH* (alcohol-deshidrogenasa), *AOX1* (alcohol-oxidasa), *HIS4* (histidinol-deshidrogenasa) y similares. Se han diseñado muchos vectores de clonación de levadura y están fácilmente disponibles. Puede diseñarse un vector para generar construcciones que utilizan los elementos necesarios para llevar a cabo la recombinación homóloga en levadura (véase, por ejemplo, Raymond y col., *BioTechniques* 26:134 (1999)). Por ejemplo, un vector de expresión tal puede incluir secuencias de *URA3* y *CEN-ARS* (secuencia de replicación autónoma) requeridas para la selección y replicación en *S. cerevisiae*. Otros vectores adecuados incluyen vectores basados en *Ylp* tales como *Ylp5*, vectores de *YRp* tales como *YRp17*, vectores de *YEp* tales como *YEp13* y vectores de *YCp* tales como *YCp19*. Los procedimientos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de estas células se desvelan, por ejemplo, Kawasaki, por la patente de EE.UU. nº 4.599.311, Kawasaki y col., patente de EE.UU. nº 4.931.373, Brake, patente de EE.UU. nº 4.870.008, Welch y col., patente de EE.UU. nº 5.037.743, y Murray y col., patente de EE.UU. nº 4.845.075. Se seleccionan células transformadas por fenotipo determinado por el marcador de selección, comúnmente resistencia a fármaco o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema de vector adecuado para su uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema de vector *POT1* desvelado por Kawasaki y col. (patente de EE.UU. nº 4.931.373), que permite seleccionar células transformadas por crecimiento en medios que contienen glucosa. Promotores y terminadores adecuados adicionales para su uso en levadura incluyen aquellos de genes de enzimas glicolíticas (véanse, por ejemplo, Kawasaki, patente de EE.UU. nº 4.599.311, Kingsman y col., patente de EE.UU. nº 4.615.974 y Bitter, patente de EE.UU. nº 4.977.092) y genes de alcohol-deshidrogenasa. Véanse también las patentes de EE.UU. nº 4.990.446, 5.063.154, 5.139.936 y 4.661.454.

En la técnica se conocen sistemas de transformación para otras levaduras, que incluyen *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*. Véanse, por ejemplo, Gleeson y col., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459 (1986) y Cregg, patente de EE.UU. nº 4.882.279. Pueden utilizarse células de *Aspergillus* según los procedimientos de McKnight y col., patente de EE.UU. nº 4.935.349. Los procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum* se desvelan por Sumino y col., patente de EE.UU. nº 5.162.228. Los procedimientos para transformar *Neurospora* se desvelan por Lambowitz, patente de EE.UU. nº 4.486.533.

Por ejemplo, el uso de *Pichia methanolica* como huésped para la producción de proteínas recombinantes se desvela por Raymond, patente de EE.UU. nº 5.716.808, Raymond, patente de EE.UU. nº 5.736.383, Raymond y col., *Yeast* 14:11-23 (1998), y en las publicaciones internacionales nº WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Las moléculas de ADN para su uso en transformar *P. methanolica* se prepararán comúnmente como plásmidos circulares bicatenarios que se linealizan preferentemente antes de la transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolica*, el promotor y el terminador en el plásmido pueden ser los de un gen de *P. methanolica* tal como un gen de utilización de alcohol de *P. methanolica* (*AUG1* o *AUG2*). Otros promotores útiles incluyen aquellos de los genes de dihidroxiacetona-sintasa (DHAS), formiato-deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma huésped se prefiere tener todo el segmento de expresión del plásmido flanqueado en ambos extremos por secuencias de ADN huésped. Un marcador de selección adecuado para su uso en *Pichia methanolica* es un gen *ADE2* de *P. methanolica* que codifica fosforibosil-5-aminoimidazol-carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), y que permite que células huésped *ade2* crezcan en ausencia de adenina. Para procedimientos industriales a gran escala en los que se desea minimizar el uso de metanol pueden usarse células huésped en las que se delecionan ambos genes de utilización de metanol (*AUG1* y *AUG2*). Para la producción de proteínas secretadas, las células huésped pueden ser deficientes en genes de la proteasa vacuolar (*PEP4* y *PRB1*). Se usa electroporación para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un polipéptido de interés en células de *P. methanolica*. Las células de *P. methanolica* pueden transformarse por electroporación usando un campo eléctrico pulsado exponencialmente decreciente que tiene una intensidad de campo de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferentemente de aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (t) de 1 a 40 milisegundos, lo más preferentemente aproximadamente 20 milisegundos.

También pueden introducirse vectores de expresión en protoplastos vegetales, tejidos vegetales intactos o células vegetales aisladas. Los procedimientos para introducir vectores de expresión en tejido vegetal incluyen la infección directa o co-cultivo de tejido vegetal con *Agrobacterium tumefaciens*, administración mediada por microproyectiles,

inyección de ADN, electroporación y similares. Véanse, por ejemplo, Horsch y col., *Science* 227:1229 (1985), Klein y col., *Biotechnology* 10:268 (1992) y Miki y col., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" en *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick y col., (eds.), páginas 67-88 (CRC Press, 1993).

5 Alternativamente, las proteínas de TACI-inmunoglobulina pueden expresarse en células huésped procariotas. Promotores adecuados que pueden usarse para producir polipéptidos de TACI-inmunoglobulina en un huésped procariota son muy conocidos para los expertos en la materia e incluyen promotores que pueden reconocer las polimerasas T4, T3, Sp6 y T7, los promotores P_R y P_L de bacteriófago lambda, los promotores *trp*, *recA*, de choque térmico, *lacUV5*, *tac*, *lpp-lacSpr*, *phoA* y *lacZ* de *E. coli*, promotores de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, promotores de *Streptomyces*, el promotor int de bacteriófago lambda, el promotor *bla* de pBR322 y el promotor CAT del gen de cloranfenicol acetiltransferasa. Los promotores procariotas han sido revisados por Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1:277 (1987), Watson y col., *Molecular Biology of the Gene*, 4ª ed. (Benjamin Cummins 1987) y por Ausubel y col. (1995).

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

20 Si se expresa una proteína de TACI-inmunoglobulina en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede conservarse en el citoplasma, normalmente como gránulos insolubles, o puede dirigirse al espacio periplásmico mediante una secuencia de secreción bacteriana. En el caso anterior, las células se lisan y los gránulos se recuperan y se desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. Entonces, el polipéptido desnaturalizado puede renaturalizarse y dimerizarse diluyendo el desnaturalizante, tal como mediante diálisis contra una disolución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguido de diálisis contra una solución salina tamponada. En este último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional rompiendo las células (mediante, por ejemplo, sonicación o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviándose así la necesidad de desnaturalización y renaturalización.

30 Procedimientos para expresar proteínas en huéspedes procariotas son muy conocidos para los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Williams y col., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies" en *DNA Cloning 2: Expression systems*, 2ª edición, Glover y col., (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995), Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies" en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995) y Georgiou, "Expression of Proteins in Bacteria" en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland y col., (eds.), página 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Procedimientos convencionales para introducir vectores de expresión en células bacterianas, de levadura, de insecto y vegetales se proporcionan, por ejemplo, por Ausubel (1995).

40 Procedimientos generales para expresar y recuperar proteína extraña producida por un sistema de células de mamífero se proporcionan, por ejemplo, por Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture" en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland y col., (eds.), páginas 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). Técnicas convencionales para recuperar la proteína producida por un sistema bacteriano se proporcionan, por ejemplo, por Grisshammer y col., "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells" en *DNA Cloning 2: Expression systems*, 2ª edición, Glover y col., (eds.), páginas 59-92 (Oxford University Press 1995). Los procedimientos establecidos para aislar proteínas recombinantes de un sistema de baculovirus se describen por Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995).

50 Como alternativa, los polipéptidos de la presente invención pueden sintetizarse mediante síntesis en fase sólida exclusiva, procedimientos en fase sólida parcial, condensación de fragmentos o síntesis por disolución clásica. Estos procedimientos de síntesis son muy conocidos para los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1963), Stewart y col., "Solid Phase Peptide Synthesis" (2ª edición), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer y Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3:3 (1986), Atherton y col., *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press 1989), Fields y Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis", *Methods in Enzymology*, volumen 289 (Academic Press 1997), y Lloyd-Williams y col., *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins* (CRC Press, Inc. 1997)). Las variaciones en las estrategias de síntesis química totales, tales como "ligadura química nativa" y "ligadura de proteínas expresadas" también son convencionales (véanse, por ejemplo, Dawson y col., *Science* 266:776 (1994), Hackeng y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:7845 (1997), Dawson, *Methods Enzymol.* 287: 34 (1997), Muir y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:6705 (1998) y Severinov y Muir, *J. Biol. Chem.* 273:16205 (1998)).

5. Ensayos de proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina

La función de las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina puede examinarse usando una variedad de enfoques para evaluar la capacidad de las proteínas de fusión para unirse a ZTNF4 o ZTNF2. Como ilustración, el Ejemplo 4 proporciona procedimientos para medir la afinidad de unión y capacidad de unión a ZTNF4.

- 5 Alternativamente, las proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina pueden caracterizarse por la capacidad para inhibir la estimulación de linfocitos B humanos por ZTNF4 soluble como se describe por Gross y col., publicación internacional n° WO00/40716. Brevemente, linfocitos B humanos se aíslan de células mononucleares de la sangre periférica usando perlas magnéticas CD19 y el sistema de separación magnética VarioMacs (Miltenyi Biotec Auburn, CA) según las instrucciones del fabricante. Los linfocitos B purificados se mezclan con ZTNF4 soluble (25 ng/ml) e IL-4 humana recombinante (10 ng/ml Pharmingen), y las células se siembran sobre placas de 96 pocillos de fondo redondo a 1×10^5 células por pocillo.

- 10 Las proteínas de TACI-inmunoglobulina solubles pueden diluirse de aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 6 ng/ml, e incubarse con los linfocitos B durante cinco días, pulsando durante la noche en el día cuatro con 1 μCi de ^3H -timidina por pocillo. Como control, la proteína de TACI-inmunoglobulina también puede incubarse con linfocitos B e IL-4 sin ZTNF4. Las placas se recogen usando el recolector de placas Packard y se cuentan usando el lector de Packard.

Este enfoque general se usó para examinar tres proteínas de fusión de TACI-Fc. Aunque todas las proteínas de fusión inhibieron la proliferación de linfocitos B, las construcciones TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 y TACI (d1-29, d120-154)-Fc5 fueron más potentes que TACI (d1-29, d107-154)-Fc5.

- 20 Están disponibles modelos animales bien establecidos para probar la eficacia *in vivo* de proteínas de TACI-inmunoglobulina en ciertos estados de enfermedad. Por ejemplo, las proteínas de TACI-inmunoglobulina pueden probarse en varios modelos animales de enfermedad autoinmunitaria tales como cepas de ratón congénitas MRL-*lpr/lpr* o NZB x NZW F1 que sirven de modelo de LES (lupus eritematoso sistémico). Tales modelos animales se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Cohen y Miller (Eds.), *Autoimmune Disease Models: A Guidebook* (Academic Press, Inc. 1994).

- 25 Las crías de un cruce entre ratones negros de Nueva Zelanda (NZB) y blancos de Nueva Zelanda (NZW) desarrollan una forma espontánea de LES que se parece mucho a LES en seres humanos. Los ratones hijo, conocidos como NZBW, empiezan a desarrollar autoanticuerpos IgM contra linfocitos T al mes de edad, y a los cinco a siete meses de edad, los autoanticuerpos anti-ADN son la inmunoglobulina dominante. La hiperactividad de linfocitos T policlonales conduce a una producción en exceso de autoanticuerpos. La deposición de estos autoanticuerpos, particularmente aquellos dirigidos contra ADN monocatenarios, está asociada al desarrollo de glomerulonefritis, que se manifiesta clínicamente como proteinuria, azoemia y muerte de insuficiencia renal.

- 30 La insuficiencia renal es la causa principal de muerte en ratones afectados con LES espontánea, y en la cepa de NZBW, este proceso es crónico y restrictivo. La enfermedad es más rápida y grave en hembras que en machos, con supervivencia media de sólo 245 días con respecto a 406 días para los varones. Aunque muchos de los ratones hembra serán sintomáticos (proteinuria) a los siete a nueve meses de edad, algunos pueden ser mucho más jóvenes o mayores cuando desarrollan síntomas. La nefritis inmunitaria mortal en los ratones NZBW es muy similar a la glomerulonefritis observada en LES humano, haciendo que este modelo murino espontáneo sea muy atractivo para probar el potencial de agentes terapéuticos para LES (Putterman y Naparstek, "MURINE MODELS OF SPONTANEOUS SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS" en *Autoimmune Disease Models: A Guidebook*, páginas 217-234 (Academic Press, Inc., 1994); Mohan y col., *J. Immunol.* 154:1470 (1995); y Daikh y col., *J. Immunol.* 159:3104 (1997)).

- 35 Como se describe por Gross y col., publicación internacional n° WO00/40716, las proteínas de TACI-inmunoglobulina pueden administrarse a ratones NZBW para monitorizar su efecto supresor sobre linfocitos B durante el periodo de cinco semanas cuando se cree que, de promedio, la producción de autoanticuerpos de linfocitos B está a altos niveles en ratones NZBW. Brevemente, 100 ratones hembra de 8 semanas de edad (NZB x NZW)F₁ pueden dividirse en seis grupos de 15 ratones. Antes del tratamiento, los ratones se monitorizan una vez al mes para proteína en orina, y se extrajo sangre para bancos de CBC y de suero. El suero puede cribarse para la presencia de autoanticuerpos. Debido a que la proteinuria es el signo distintivo de la glomerulonefritis, los niveles de proteína en orina se monitorizan por tiras reactivas a intervalos regulares durante el transcurso del estudio. El tratamiento puede empezar cuando los ratones tienen aproximadamente cinco meses de edad. Los ratones reciben inyecciones intraperitoneales de vehículo solo (solución salina tamponada con fosfato) o proteína de TACI-inmunoglobulina humana (proteína de control) o de TACI-inmunoglobulina (por ejemplo, 20 a 100 μg de proteína de prueba por dosis) tres veces a la semana durante cinco semanas.

- 40 La sangre se recoge dos veces durante el tratamiento, y se recogerá al menos dos veces tras el tratamiento. Los valores de las tiras reactivas de orina para proteinuria y los pesos corporales se determinan cada dos semanas después de empezar el tratamiento. Se recogen sangre, valor de tiras reactivas de orina y peso corporal en el momento de la eutanasia. El bazo y el timo se dividen para análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia e histología. También se recogen glándulas salivales submandibulares, la cadena de ganglios linfáticos

mesentéricos, lóbulo del hígado con vesícula biliar, intestino ciego y grueso, estómago, intestino delgado, páncreas, riñón derecho, glándula suprarrenal, lengua con tráquea y esófago, corazón y pulmones para la histología.

Se han usado modelos murinos para encefalomiелitis alérgica experimental como herramienta para investigar tanto los mecanismos de enfermedad inmunomediada como los procedimientos de posible intervención terapéutica. El modelo se parece a esclerosis múltiple humana, y produce desmielinización como resultado de la activación de linfocitos T para neuroproteínas tales como proteína básica de mielina, o proteína de proteolípido. La inoculación con antígeno conduce a la inducción de CD4+, linfocitos T restringidos al MHC de clase II (Th1). Los cambios en el protocolo para encefalomiелitis alérgica experimental pueden producir variantes agudas, de recaída crónica o de transferencia pasiva del modelo (Weinberg y col., *J. Immunol.* 162:1818 (1999); Mijaba y col., *Cell. Immunol.* 186: 94 (1999); y Glabinski, *Meth. Enzym.* 288:182 (1997)).

Gross y col., publicación internacional n° WO00/40716, describen un enfoque para evaluar la eficacia de proteínas de TACI-inmunoglobulina en la mejora de síntomas asociados a encefalomiелitis alérgica experimental. Brevemente, a 25 ratones PLxSJL F1 hembra (12 semanas de edad) se les administra una inyección subcutánea de 125 µg/ratón de antígeno (proteína de proteolípido de mielina, PLP, residuos 139-151), formulada en adyuvante completo de Freund. Los ratones se dividen en cinco grupos de cinco ratones. Se administran inyecciones intraperitoneales de toxina de pertussis (400 ng) en el día 0 y 2. A los grupos se les administra una dosis de 1x, 10x o 100x de proteína de TACI-inmunoglobulina, un grupo recibirá vehículo solo, y un grupo no recibirá tratamiento. La terapia de prevención empieza el día 0, la terapia de intervención empieza el día 7, o en la aparición de signos clínicos. Los signos de enfermedad, pérdida de peso y la parálisis se manifiestan en aproximadamente 10 a 14 días, y duran durante aproximadamente una semana. Los animales se evalúan diariamente recogiendo pesos corporales y asignando una puntuación clínica que se corresponde con el grado de sus síntomas. Los signos clínicos de encefalomiелitis alérgica experimental aparecen en el plazo de 10 a 14 días desde la inoculación y persisten durante aproximadamente una semana. Al final del estudio, todos los animales se sacrifican por sobredosis de gas y se les practica la autopsia. El cerebro y la columna vertebral se recogen para histología o se congelan para análisis de ARNm. Los datos de peso corporal y puntuación clínica se representan por individuo y por grupo.

En el modelo de artritis inducida por colágeno, los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se parece mucho a artritis reumatoide humana. Como la artritis inducida por colágeno comparte características inmunológicas y patológicas similares con la artritis reumatoide, esto hace que sea un modelo ideal para el cribado de posibles compuestos antiinflamatorios humanos. Otra ventaja de usar el modelo de artritis inducido por colágeno es que los mecanismos de patogénesis son conocidos. Se han identificado epítopes de linfocitos T y B en el colágeno de tipo II, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpo anti-colágeno) e inflamatorios (citocinas, quimiocinas y enzimas de degradación de la matriz) relacionados con la artritis inmunomediada, y pueden usarse para evaluar la eficacia de compuestos de prueba en los modelos (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407 (1999); Williams y col., *Immunol.* 89:9784 (1992); Myers y col., *Life Sci.* 61:1861 (1997); y Wang y col., *Immunol.* 92:8955 (1995)).

Gross y col., publicación internacional n° WO00/40716, describen un procedimiento para evaluar la eficacia de proteínas de TACI-inmunoglobulina en la mejora de síntomas asociados a artritis inducida por colágeno. En resumen, ratones DBA/1J macho de 8 semanas de edad (Jackson Labs) se dividen en grupos de cinco ratones/grupo y se les administran dos inyecciones subcutáneas de 50 a 100 µl de 1 mg/ml de colágeno (origen de pollo o bovino), a intervalos de tres semanas. Un control no recibe inyecciones de colágeno. La primera inyección se formula en adyuvante completo de Freund, y la segunda inyección se formula en adyuvante incompleto de Freund. La proteína de TACI-inmunoglobulina se administra profilácticamente en o antes de la segunda inyección, o después de que el animal desarrolle una puntuación clínica de dos o más que persiste al menos 24 horas. Los animales empiezan a mostrar síntomas de artritis tras la segunda inyección de colágeno, normalmente en el plazo de dos a tres semanas. Por ejemplo, pueden administrarse TACI-Fc, una proteína de control, IgFc humana o solución salina tamponada con fosfato (vehículo) profilácticamente empezando siete días antes de la segunda inyección (día -7). Las proteínas pueden administrarse a 100 µg, administrarse tres veces a la semana como una inyección intraperitoneal de 200 µl, y se continúa durante cuatro semanas.

En el modelo de artritis inducida por colágeno, el grado de enfermedad se evalúa en cada pata usando un calibrador para medir el espesor de la pata y asignando una puntuación clínica a cada pata. Por ejemplo, una puntuación clínica de "0" indica un ratón normal, una puntuación de "1" indica que uno o más dedos de la pata están inflamados, una puntuación de "2" indica inflamación leve de la pata, una puntuación de "3" indica inflamación moderada de la pata y una puntuación de "4" indica inflamación grave de la pata. Los animales se sacrifican después de haberse establecido la enfermedad durante un periodo fijo de tiempo, normalmente siete días. Las patas se recogen para histología o análisis de ARNm, y el suero se recoge para ensayos de inmunoglobulina y citocinas.

La miastenia grave es otra enfermedad autoinmunitaria para la que están disponibles modelos murinos. La miastenia grave es un trastorno de transmisión neuromuscular que implica la producción de autoanticuerpos dirigidos contra el receptor nicotínico de acetilcolina. Esta enfermedad es adquirida o heredada con características que incluyen debilidad anormal y fatiga de esfuerzo.

Se ha establecido un modelo murino de miastenia grave (Christadoss y col., "Establishment of a Mouse Model of Myasthenia gravis Which Mimics Human Myasthenia gravis Pathogenesis for Immune Intervention" en *Immunobiology of Proteins and Peptides VIII*, Atassi and Bixler (Eds.), páginas 195-199 (1995)). La miastenia grave autoinmune experimental es una enfermedad mediada por anticuerpos caracterizada por la presencia de anticuerpos para el receptor de acetilcolina. Estos anticuerpos destruyen el receptor conduciendo a impulsos eléctricos neuromusculares defectuosos, produciendo debilidad muscular. En el modelo de miastenia grave autoinmune experimental, los ratones se inmunizan con el receptor nicotínico de acetilcolina. Los signos clínicos de miastenia grave se vuelven evidentes semanas después de la segunda inmunización. La miastenia grave autoinmune experimental se evalúa por varios procedimientos que incluyen medición de niveles en suero de anticuerpos receptores de acetilcolina por radioinmunoensayo (Christadoss y Dauphinee, *J. Immunol.* 136:2437 (1986); Lindstrom y col., *Methods Enzymol.* 74:432 (1981)), medición del receptor de acetilcolina muscular, o electromiografía (Coligan y col. (Eds.), *Protocols in Immunology*, vol. 3, página 15.8.1 (John Wiley & Sons, 1997)).

El efecto de TACI-inmunoglobulina sobre la miastenia grave autoinmune experimental pueden determinarse administrando proteínas de fusión durante miastenia grave clínica en curso en ratones B6. Por ejemplo, 100 ratones B6 se inmunizan con 20 µg de receptor de acetilcolina en adyuvante completo de Freund los días 0 y 30. Aproximadamente del 40 al 60% de los ratones desarrollará miastenia grave clínica de moderada (grado 2) a grave (grado 3) después del refuerzo con receptor de acetilcolina. Los ratones con enfermedad clínica de grado 2 y 3 se dividen en tres grupos (con grados iguales de debilidad) y se pesan (los ratones con debilidad también pierden peso, ya que tienen dificultad para consumir alimentos y agua) y se sangran para suero (para anticuerpo anti-receptor de acetilcolina y nivel de isotipo antes del tratamiento). El grupo A se inyecta I.P con solución salina tamponada con fosfato, el grupo B se inyecta intraperitonealmente con IgG-Fc humana como proteína de control (100 µg) y el grupo C se inyecta con 100 µg de TACI-Fc tres veces a la semana durante cuatro semanas. Los ratones se criban para la debilidad muscular clínica dos veces a la semana y se pesan y se sangran para suero 15 y 30 días después del comienzo del tratamiento. La sangre completa se recoge el día 15 para determinar la relación de linfocitos T/B por análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia usando marcadores B220 y CD5. Los ratones supervivientes se sacrifican 30 a 45 días después del inicio del tratamiento, y sus cuerpos muertos se congelan para la posterior extracción de receptor de acetilcolina muscular para determinar la pérdida de receptor de acetilcolina muscular, la patología primaria en miastenia grave (véase, por ejemplo, Coligan y col. (Eds.), *Protocols in Immunology*. Vol. 3, página 15.8.1 (John Wiley & Sons, 1997)).

Los anticuerpos en suero para el receptor de acetilcolina muscular de ratón pueden determinarse por un radioinmunoensayo establecido, y los isotipos de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina (IgM, IgG1, IgG2b y IgG2c) se miden por ELISA. Tales procedimientos son conocidos. Se determinan los efectos de TACI-inmunoglobulina sobre la miastenia grave clínica en curso, el anticuerpo anti-receptor de acetilcolina y el nivel de isotipo, y la pérdida de receptor de acetilcolina muscular.

Aproximadamente 100 ratones pueden inmunizarse con 20 µg de receptor de acetilcolina en adyuvante completo de Freund en el día 0 y 30. Los ratones con miastenia grave clínica se dividen en cuatro grupos. El grupo A se inyecta intraperitonealmente con 100 µg de Fc de control, el grupo B se inyecta con 20 µg de Fc de control, el grupo C se inyecta con 100 µg de TACI-Fc y el grupo D se inyecta con 20 µg de TACI-Fc tres veces a la semana durante cuatro semanas. Los ratones se pesan y se sangran para suero antes y 15 y 30 días después del inicio del tratamiento. El suero se prueba para anticuerpo anti-receptor de acetilcolina e isotipos como se ha descrito anteriormente. También puede medirse la pérdida de receptor de acetilcolina muscular.

Los expertos en la materia pueden determinar otros ensayos adecuados de proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina.

6. Producción de conjugados de TACI-inmunoglobulina

La presente memoria descriptiva describe composiciones de TACI-inmunoglobulina químicamente modificadas en las que un polipéptido de TACI-inmunoglobulina está ligado a un polímero. Normalmente, el polímero es soluble en agua de manera que el conjugado de TACI-inmunoglobulina no precipita en un entorno acuoso tal como un entorno fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que ha sido modificado para tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación, o un aldehído para la alquilación. De esta forma puede controlarse el grado de polimerización. Un ejemplo de un aldehído reactivo es propionaldehído de polietilenglicol, o mono-alcoxi (C₁-C₁₀), o derivados de ariloxi del mismo (véase, por ejemplo, Harris y col., patente de EE.UU. n° 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o sin ramificar. Además, puede usarse una mezcla de polímeros para producir conjugados de TACI-inmunoglobulina.

Los conjugados de TACI-inmunoglobulina usados para terapia pueden comprender restos de polímero solubles en agua farmacéuticamente aceptables. Polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-alcoxi (C₁-C₁₀)-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vinilpirrolidona)-PEG, tresilmonometoxi-PEG, propionaldehído de PEG, bis-succinimidilcarbonato-PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico), dextrano, celulosa, u otros polímeros basados en hidratos de carbono. PEG adecuados pueden tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000 que incluyen, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y

25.000. Un conjugado de TACI-inmunoglobulina también puede comprender una mezcla de tales polímeros solubles en agua.

Un ejemplo de un conjugado de TACI-inmunoglobulina comprende un resto de TACI-inmunoglobulina y un resto de poli(óxido de alquilo) unido al extremo N de la TACI-inmunoglobulina. El PEG es un poli(óxido de alquilo) adecuado. Como ilustración, la TACI-inmunoglobulina puede modificarse con PEG, un procedimiento conocido como "PEGilación". La PEGilación de TACI-inmunoglobulina puede llevarse a cabo por cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, el documento EP 0 154 316, Delgado y col., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9:249 (1992), Duncan y Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27:290 (1994) y Francis y col., *Int J Hematol* 68:1 (1998)). Por ejemplo, la PEGilación puede realizarse por una reacción de acilación o por una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. En un enfoque alternativo, conjugados de TACI-inmunoglobulina se forman condensando PEG activado, en el que un grupo hidroxilo o amino del extremo de PEG se ha sustituido con un ligador activado (véase, por ejemplo, Karasiewicz y col., patente de EE.UU. nº 5.382.657).

La PEGilación por acilación normalmente requiere hacer reaccionar un derivado de éster activo de PEG con un polipéptido de TACI-inmunoglobulina. Un ejemplo de un éster de PEG activado es PEG esterificado con *N*-hidroxisuccinimida. Como se usa en este documento, el término "acilación" incluye los siguientes tipos de enlaces entre TACI-inmunoglobulina y un polímero soluble en agua: amida, carbamato, uretano y similares. Los procedimientos para preparar TACI-inmunoglobulina PEGilada por acilación comprenderán normalmente las etapas de (a) hacer reaccionar un polipéptido de TACI-inmunoglobulina con PEG (tal como un éster reactivo de un aldehído derivado de PEG) en condiciones por las que uno o más grupos PEG se unen a TACI-inmunoglobulina, y (b) obtener el (los) producto(s) de reacción. Generalmente, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán basándose en parámetros conocidos y resultados deseados. Por ejemplo, cuanto mayor sea la relación de PEG:TACI-inmunoglobulina, mayor será el porcentaje de producto de TACI-inmunoglobulina poliPEGilado.

El producto de PEGilación por acilación es normalmente un producto de TACI-inmunoglobulina poliPEGilado, en el que los grupos ϵ -amino de lisina se PEGilan por un grupo de enlace acilo. Un ejemplo de un enlace de conexión es una amida. Normalmente, la TACI-inmunoglobulina resultante estará mono-, di-, o tri-pegilada al menos el 95%, aunque pueden formarse algunas especies con mayores grados de PEGilación dependiendo de las condiciones de reacción. Las especies PEGiladas pueden separarse de polipéptidos de TACI-inmunoglobulina sin conjugar usando procedimientos de purificación convencionales tales como diálisis, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares.

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

La derivatización por alquilación reductora para producir un producto mono-PEGilado aprovecha la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios disponibles para la derivatización. Normalmente, la reacción se realiza a un pH que permite aprovechar las diferencias de pKa entre los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y el grupo α -amino del residuo del extremo N de la proteína. Por tal derivatización selectiva se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo tal como un aldehído a una proteína. La conjugación con el polímero se produce predominantemente en el extremo N de la proteína sin modificación significativa de otros grupos reactivos tales como los grupos amino de la cadena lateral de lisina. La presente invención proporciona una preparación sustancialmente homogénea de conjugados de monopolímeros de TACI-inmunoglobulina.

La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de molécula de conjugado de TACI-inmunoglobulina monopolimérico puede comprender las etapas de: (a) hacer reaccionar un polipéptido de TACI-inmunoglobulina con un PEG reactivo bajo condiciones de alquilación reductoras a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva del grupo α -amino en el extremo amino de la TACI-inmunoglobulina, y (b) obtener el (los) producto(s) de reacción. El agente reductor usado para la alquilación reductora debe ser estable en disolución acuosa y puede reducir sólo la base de Schiff formada en el procedimiento inicial de alquilación reductora. Agentes reductores ilustrativos incluyen borohidruro de sodio, sodio, dimetilamina-borano, trimetilamina-borano y piridina-borano.

Para una población sustancialmente homogénea de conjugados de TACI-inmunoglobulina monopoliméricos, las condiciones de la reacción de alquilación reductora son aquellas que permiten la unión selectiva del resto de polímero soluble en agua al extremo N de TACI-inmunoglobulina. Tales condiciones de reacción proporcionan generalmente diferencias de pKa entre los grupos amino de lisina y el grupo α -amino en el extremo N. El pH también afecta la relación de polímero con respecto a proteína que va a usarse. En general, si el pH es menor, se deseará un mayor exceso de polímero con respecto a proteína debido a que cuanto menos reactivo sea el grupo α del extremo N, más polímero se necesitará para lograr condiciones óptimas. Si el pH es mayor, polímero:TACI-inmunoglobulina no necesita ser tan grande debido a que están disponibles más grupos reactivos. Normalmente, el pH se encontrará dentro del intervalo de 3 a 9, o 3 a 6.

Otro factor a considerar es el peso molecular del polímero soluble en agua. Generalmente, cuanto mayor sea el peso molecular del polímero, menor será el número de moléculas de polímero que pueden unirse a la proteína. Para las reacciones de PEGilación, el peso molecular es aproximadamente a aproximadamente 100 kDa, aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, o aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 25 kDa. La relación molar de polímero soluble en agua con respecto a TACI-inmunoglobulina estará generalmente en el intervalo de 1:1 a 100:1. Normalmente, la relación molar de polímero soluble en agua con respecto a TACI-inmunoglobulina será 1:1 a 20:1 para la poliPEGilación, y 1:1 a 5:1 para la monoPEGilación.

Los procedimientos generales para producir conjugados que comprenden un polipéptido y restos de polímeros solubles en agua se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Karasiewicz y col., patente de EE.UU. n° 5.382.657, Greenwald y col., patente de EE.UU. n° 5.738.846, Nieforth y col., Clin. Pharmacol. Ther. 59:636 (1996), Monkarsh y col., Anal. Biochem. 247:434 (1997)).

La presente memoria descriptiva describe composiciones que comprenden un péptido o polipéptido descrito en este documento. Tales composiciones pueden comprender adicionalmente un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico convencional. Ejemplos de vehículos incluyen agua, disolución de tampón, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares.

7. Aislamiento de polipéptidos de TACI-inmunoglobulina

Los polipéptidos de la presente invención pueden purificarse a al menos aproximadamente el 80% de pureza, a al menos aproximadamente el 90% de pureza, a al menos aproximadamente el 95% de pureza, o superior al 95% de pureza con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y libres de agentes infecciosos y pirógenos. Los polipéptidos de la presente invención también pueden purificarse a un estado farmacéuticamente puro que es superior al 99,9% de pureza. En ciertas preparaciones, el polipéptido purificado está sustancialmente libre de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

Pueden usarse procedimientos de fraccionamiento y/o de purificación convencionales para obtener preparaciones de polipéptidos de TACI-inmunoglobulina sintéticos, y polipéptidos de TACI-inmunoglobulina recombinantes purificados a partir de células huésped recombinantes. En general, la precipitación con sulfato de amonio y la extracción con ácido o caótropro pueden usarse para el fraccionamiento de muestras. Etapas de purificación a modo de ejemplo pueden incluir hidroxapatita, exclusión por tamaño, FPLC y cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa. Medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poli(acrilamida), sílices especializados y similares. Son adecuados derivados de PEI, DEAE, QAE y Q. Medios cromatográficos a modo de ejemplo incluyen aquellos medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo tales como Phenyl-Sepharose FF (Farmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Farmacia) y similares; o resinas poli(acrilicas) tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticulada, perlas de poliestireno, resinas de poli(acrilamida) reticulada y similares que son insolubles en las condiciones en que van a usarse. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de hidrato de carbono.

Ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida y derivados de carboxilo y amino para químicas de acoplamiento a carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son muy conocidos y ampliamente usados en la materia, y están disponibles de proveedores comerciales. La selección de un procedimiento particular para el aislamiento y la purificación de polipéptidos es objeto del diseño rutinario y se determina en parte por las propiedades del soporte elegido. Véanse, por ejemplo, Affinity Chromatography: Principles & Methods (Farmacia LKB Biotechnology 1988) y Doonan, Protein Purification Protocols (The Humana Press 1996).

Variaciones adicionales en el aislamiento y la purificación de TACI-inmunoglobulina pueden ser creados por aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti-TACI o anti-Fc para aislar grandes cantidades de proteína por purificación por inmutofinidad.

Los polipéptidos de la presente invención también pueden aislarse por explotación de propiedades particulares. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de adsorción de iones metálicos inmovilizados (IMAC) para purificar proteínas ricas en histidina que incluyen aquellas que comprenden marcas de polihistidina. Brevemente, un gel se carga primero con iones de metal divalente para formar un quelato (Sulkowski, Trends in Biochem. 3:1 (1985)). Las proteínas ricas en histidina se adsorberán a esta matriz con afinidades diferentes que dependerán del ión metálico usado, y se eluirán por elución competitiva, reducción del pH o uso de agentes quelantes fuertes. Otros procedimientos de purificación incluyen purificación de proteínas glicosiladas por cromatografía de afinidad con lectina, cromatografía con proteína A y cromatografía de intercambio iónico (M. Deutscher, (ed.), Meth. Enzymol. 182:529 (1990)).

Los polipéptidos de TACI-inmunoglobulina o fragmentos de los mismos también pueden prepararse por síntesis química, como se ha descrito anteriormente. Los polipéptidos de TACI-inmunoglobulina pueden ser monómeros o

multímeros; glicosilados o no glicosilados; PEGilados o no PEGilados; y pueden o pueden no incluir un residuo de aminoácido de metionina inicial. Una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina puede estar no glicosilada, glicosilada o glicosilada sólo en el resto de TACI o en el resto de inmunoglobulina. El resto de inmunoglobulina puede obtenerse a partir de un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

5 **8. Usos terapéuticos de polipéptidos de TACI-inmunoglobulina**

Las proteínas de TACI-inmunoglobulina pueden usarse para modular el sistema inmunitario uniendo ZTNF4 o ZTNF2 y, por tanto, previniendo la unión de estos ligandos a receptores de TACI o BCMA endógenos. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva describe el uso de proteínas de TACI-inmunoglobulina para un sujeto que carece de una cantidad adecuada de receptores de TACI o BCMA, o que produce un exceso de ZTNF4 o ZTNF2. Estas moléculas pueden administrarse a cualquier sujeto en necesidad de tratamiento, y la presente invención contempla usos terapéuticos tanto veterinarios como humanos. Sujetos ilustrativos incluyen sujetos mamíferos tales como animales de granja, animales domésticos y pacientes humanos.

Los polipéptidos de TACI-inmunoglobulina pueden usarse para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, cánceres de linfocitos B, inmunomodulación, EII y cualquier patología mediada por anticuerpos (por ejemplo, ITCP, miastenia grave y similares), enfermedad renal, respuesta inmunitaria a linfocitos T indirecta, rechazo de injerto y enfermedad de injerto frente a huésped. Los polipéptidos de la presente invención pueden elegirse como diana para regular específicamente las respuestas de linfocitos B durante la respuesta inmunitaria. Adicionalmente, los polipéptidos de la presente invención pueden usarse para modular el desarrollo de linfocitos B, el desarrollo de otras células, producción de anticuerpos y producción de citocinas. Los polipéptidos de la presente invención también pueden modular la comunicación de linfocitos T y B neutralizando los efectos proliferativos de ZTNF4.

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

ZTNF4 se expresa en células CD8⁺, monocitos, células dendríticas, monocitos activados, que indica que, en ciertos trastornos autoinmunitarios, los linfocitos T citotóxicos podrían estimular la producción de linfocitos B mediante la producción en exceso de ZTNF4. Las proteínas inmunodepresoras que bloquean selectivamente la acción de linfocitos B serían útiles en el tratamiento de enfermedad. La producción de autoanticuerpos es común a varias enfermedades autoinmunitarias y contribuye a la destrucción de tejidos y a la exacerbación de enfermedad. Los autoanticuerpos también pueden conducir a la aparición de complicaciones en la deposición de complejos inmunes y conducen a muchos síntomas de lupus eritematoso sistémico, que incluyen insuficiencia renal, síntomas neurálgicos y muerte. La modulación de la producción de anticuerpos independiente de respuesta celular también sería beneficiosa en muchos estados de enfermedad. También se ha mostrado que los linfocitos B desempeñan una función en la secreción de inmunoglobulinas artritogénicas en artritis reumatoide. Como tal, la inhibición de la producción de anticuerpos para ZTNF4 sería beneficiosa en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como miastenia grave, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil de evolución poliarticular y artritis psoriásica. Los agentes terapéuticos inmunosupresores tales como proteínas de TACI-inmunoglobulina que bloquean o neutralizan selectivamente la acción de linfocitos B serían útiles para tales fines.

La invención proporciona usos que emplean proteínas de TACI-inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones para bloquear o neutralizar selectivamente las acciones de linfocitos B en asociación con enfermedad renal terminal que pueden o pueden no asociarse a enfermedades autoinmunitarias. Tales usos también serían útiles para tratar enfermedades renales inmunológicas. Tales usos serían útiles para tratar glomerulonefritis asociada a enfermedades tales como nefropatía membranosa, nefropatía por IgA o enfermedad de Berger, nefropatía por IgM, enfermedad de Goodpasture, glomerulonefritis postinfecciosa, enfermedad mesangioproliferativa, leucemia linfocítica crónica, síndrome nefrótico con cambio mínimo. Tales usos también servirían de aplicaciones terapéuticas para tratar glomerulonefritis secundaria o vasculitis asociada a tales enfermedades como lupus, poliarteritis, Henoch-Schonlein, esclerodermia, enfermedades relacionadas con el VIH, amiloidosis o síndrome urémico hemolítico. Los usos de la presente invención también serían útiles como parte de una aplicación terapéutica para tratar nefritis intersticial o pielonefritis asociada a pielonefritis crónica, abuso de analgésicos, nefrocalcinosis, nefropatía producida por otros agentes, nefrolitiasis o nefritis intersticial crónica o aguda.

Los usos descritos en este documento también incluyen el uso de proteínas de TACI-inmunoglobulina en el tratamiento de enfermedades hipertensivas o de vasos grandes que incluyen estenosis de la arteria renal u oclusión y émbolos por colesterol o émbolos renales.

La presente invención también proporciona tratamiento de neoplasias renales o urológicas, mielomas múltiples, linfomas, neuropatía o amiloidosis de la cadena ligera, como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona bloquear o inhibir linfocitos B activados usando proteínas de TACI-inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones para el tratamiento de asma y otras enfermedades de las vías respiratorias crónicas tales como bronquitis y enfisema. Las proteínas de TACI-inmunoglobulina descritas en este documento también pueden usarse para tratar síndrome de Sjögren.

- 5 También se proporcionan usos para inhibir o neutralizar una respuesta de linfocitos T efectores usando proteínas de TACI-inmunoglobulina para su uso en inmunosupresión, en particular para uso terapéutico tal como para enfermedad de injerto frente a huésped y rechazo de injerto. Además, las proteínas de TACI-inmunoglobulina serían útiles en protocolos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) y enfermedad de Crohn. La presente invención tiene valor terapéutico adicional para
10 tratar enfermedades inflamatorias crónicas, en particular para reducir dolor de articulaciones, hinchazón, anemia y otros síntomas asociados, además de tratar choque séptico.

- Están disponibles modelos animales bien establecidos para probar la eficacia *in vivo* de proteínas de TACI-inmunoglobulina de la presente invención en ciertos estados de enfermedad. En particular, las proteínas de TACI-inmunoglobulina pueden probarse *in vivo* en varios modelos animales de enfermedad autoinmunitaria tales como cepas de ratón congénitas MRL-*lpr/lpr* o NZB x NZW F1 que sirven de modelo de LES (lupus eritematoso sistémico). Tales modelos animales se conocen en la técnica.

- Las crías de un cruce entre ratones negros de Nueva Zelanda (NZB) y blancos de Nueva Zelanda (NZW) desarrollan una forma espontánea de LES que se parece mucho a LES en seres humanos. Los ratones hijo, conocidos como NZBW, empiezan a desarrollar autoanticuerpos IgM contra linfocitos T al mes de edad, y a los 5-7 meses de edad, los autoanticuerpos Ig anti-ADN son la inmunoglobulina dominante. La hiperactividad de linfocitos B policlonales conduce a la producción en exceso de autoanticuerpos. La deposición de estos autoanticuerpos, particularmente aquellos dirigidos contra ADN monocatenario, está asociada al desarrollo de glomerulonefritis, que se manifiesta clínicamente como proteinuria, azoemia y muerte de insuficiencia renal. La insuficiencia renal es la causa principal de muerte en ratones afectados con LES espontánea, y en la cepa de NZBW, este proceso es crónico y restrictivo.
20 La enfermedad es más rápida y grave en hembras que en machos, con supervivencia media de sólo 245 días con respecto a 406 días para los varones. Aunque muchos de los ratones hembra serán sintomáticos (proteinuria) a los 7-9 meses de edad, algunos pueden ser mucho más jóvenes o mayores cuando desarrollan síntomas. La nefritis inmunitaria mortal en los ratones NZBW es muy similar a la glomerulonefritis observada en LES humano, haciendo que este modelo murino espontáneo sea útil para probar el potencial de agentes terapéuticos para LES.

- 30 Se han usado modelos de ratón para encefalomielitis alérgica experimental (EAE) como herramienta para investigar tanto los mecanismos de enfermedad inmunomediada como los procedimientos de posible intervención terapéutica. El modelo se parece a esclerosis múltiple humana, y produce desmielinización como resultado de la activación de linfocitos T para neuroproteínas tales como proteína básica de mielina (MBP), o proteína de proteolípido (PLP). La inoculación con antígeno conduce a la inducción de CD4+, linfocitos T restringidos al MHC de clase II (Th1). Los cambios en el protocolo para EAE pueden producir variantes agudas, de recaída crónica o de transferencia pasiva del modelo.

- En el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se parece mucho a la artritis reumatoide humana (AR). Como la AIC comparte características inmunológicas y patológicas similares con AR, esto hace que sea un modelo ideal para el cribado de posibles compuestos antiinflamatorios humanos. Otra ventaja de usar el modelo de AIC es que los mecanismos de patogénesis son conocidos. Se han identificado epítopes de linfocitos T y B en el colágeno de tipo II, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpo anti-colágeno) e inflamatorios (citocinas, quimiocinas y enzimas de degradación de la matriz) relacionados con la artritis inmunomediada, y pueden usarse para evaluar la eficacia de compuestos de prueba en los modelos.

- 45 La miastenia grave (MG) es otra enfermedad autoinmunitaria para la que están disponibles modelos murinos. La MG es un trastorno de transmisión neuromuscular que implica la producción de autoanticuerpos dirigidos contra el receptor nicotínico de acetilcolina (AChR). La MG es adquirida o heredada con características que incluyen debilidad anormal y fatiga de esfuerzo. Se ha establecido un modelo de ratón de MG. La miastenia grave autoinmune experimental (MGAE) es una enfermedad mediada por anticuerpos caracterizada por la presencia de anticuerpos para AChR. Estos anticuerpos destruyen el receptor conduciendo a impulsos eléctricos neuromusculares defectuosos, produciendo debilidad muscular. En el modelo de MGAE, los ratones se inmunizan con el receptor nicotínico de acetilcolina. Los signos clínicos de MG se vuelven evidentes semanas después de la segunda inmunización. La MGAE se evalúa por varios procedimientos que incluyen medición de niveles en suero de anticuerpos AChR por radioinmunoensayo, medición de AChR muscular o electromiografía.

- 55 Generalmente, la dosificación de proteína de TACI-inmunoglobulina administrada variará dependiendo de factores tales como edad del sujeto, peso, altura, sexo, condición médica general e historia médica previa. Normalmente se desea proveer al receptor de una dosificación de proteína de TACI-inmunoglobulina que esté en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal de sujeto), aunque también puede administrarse una menor o mayor dosificación según dicten las circunstancias.

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

- 5 Vías de administración adicionales incluyen oral, a la membrana mucosa, pulmonar y transcutánea. La administración por vía oral es adecuada para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas proteinoides, microesferas de policianoacrilato y sistemas basados en lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins" en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). La viabilidad de una administración intranasal se ejemplifica por un modo tal de administración insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe y Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:199 (1999)). Pueden prepararse partículas secas o líquidas que comprenden TACI-inmunoglobulina e inhalarse con la ayuda de dispersadores de polvo seco, generadores de aerosol líquido o nebulizadores (por ejemplo, Pettit y Gombotz, *TIBTECH* 16:343 (1998); Patton y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:235 (1999)). Este enfoque se ilustra por el sistema de control de la diabetes AERX, que es un inhalador electrónico de mano que administra insulina aerosolizada a los pulmones. Los estudios han mostrado que proteínas de hasta 48.000 kDa han sido administradas a través de la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonidos de baja frecuencia, que ilustra la viabilidad de la administración transcutánea (Mitrageoti y col., *Science* 269:850 (1995)). La administración transdérmica usando electroporación proporciona otro medio para administrar una proteína de TACI-inmunoglobulina (Potts y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:213 (1997)).
- 20 Una composición farmacéutica que comprende una proteína de TACI-inmunoglobulina puede formularse según procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por lo que las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. Solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 Otros vehículos adecuados son muy conocidos para aquellos en la materia. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª edición (Mack Publishing Company 1995).

30 Para los fines de terapia, las proteínas de TACI-inmunoglobulina se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una proteína de TACI-inmunoglobulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia produce un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia la respuesta inflamatoria. Como otro ejemplo, un agente usado para inhibir el crecimiento de células tumorales es fisiológicamente significativo si la administración del agente produce una disminución en el número de células tumorales, disminución de metástasis, una disminución en el tamaño de un tumor sólido, o aumento de la necrosis de un tumor. Además, un agente usado para tratar lupus eritematoso sistémico es fisiológicamente significativo si la administración del agente produce una disminución de anticuerpos anti-ADN bicatenario en circulación, o una disminución en al menos uno de los siguientes síntomas: fiebre, dolor de articulaciones, lesiones eritematosas de la piel u otras características de lupus eritematoso sistémico. Un ejemplo de una indicación general de que una proteína de TACI-inmunoglobulina se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz es que, tras la administración a un sujeto, hay una disminución en los niveles de ZTNF4 en circulación (BLYS).

40 Una composición farmacéutica que comprende una proteína de TACI-inmunoglobulina puede proporcionarse en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Formas líquidas se ilustran por disoluciones inyectables y suspensiones orales. Formas sólidas a modo de ejemplo incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra por bombas miniosmóticas e implantes (Bremer y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery" en *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps" en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant" en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)).

50 Los liposomas proporcionan un medio para administrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto intravenosamente, intraperitonealmente, intratecalmente, intramuscularmente, subcutáneamente, o por administración por vía oral, inhalación o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas de lípidos que rodean los compartimentos acuosos (véase, generalmente, Bakker-Woudenberg y col., *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.* 12 (Suppl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993) y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers" en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas son similares en composición a las membranas celulares y, como resultado, los liposomas pueden administrarse con seguridad y son biodegradables. Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares, y los liposomas pueden variar en tamaño con diámetros que oscilan de 0,02 μm a más de 10 μm . Una variedad de agentes pueden estar encapsulados en liposomas: reparto de agentes hidrófobos en las bicapas y reparto de agentes hidrófilos dentro del (de los) espacio(s) acuoso(s) interno(s) (véase, por ejemplo, Machy y col., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), y Ostro y col., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576 (1989)). Además, es posible controlar la

disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño del liposoma, el número de bicapas, composición de lípidos, además de las características de carga y superficie de los liposomas.

Los liposomas pueden adsorberse a prácticamente cualquier tipo de célula y luego liberar lentamente el agente encapsulado. Alternativamente, un liposoma absorbido puede ser endocitado por células que son fagocíticas. La endocitosis va seguida de degradación intralisosómica de lípidos liposómicos y liberación de los agentes encapsulados (Scherphof y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Después de la administración intravenosa, los liposomas pequeños (0,1 a 1,0 μm) son normalmente absorbidos por células del sistema reticuloendotelial, localizadas principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas superiores a 3,0 μm se depositan en el pulmón. Esta captación preferencial de liposomas más pequeños por las células del sistema reticuloendotelial se ha usado para administrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores del hígado.

El sistema reticuloendotelial puede ser sorteado por varios procedimientos que incluyen saturación con grandes dosis de partículas de liposomas, o inactivación de macrófagos selectivos por medios farmacológicos (Claassen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). Además, se ha mostrado que la incorporación de fosfolípidos derivatizados de glicolípidos o polietilenglicoles a membranas de liposomas produce una captación significativamente reducida por el sistema reticuloendotelial (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Los liposomas también pueden prepararse para elegir como diana células u órganos particulares variando la composición de los fosfolípidos o insertando receptores o ligandos en los liposomas. Por ejemplo, los liposomas preparados con un alto contenido de un tensioactivo no iónico se han usado para elegir como diana el hígado (Hayakawa y col., patente japonesa 04-244.018; Kato y col., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja, α -tocoferol y aceite de ricino hidrogenado etoxilado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla a vacío y luego reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha mostrado que una formulación liposómica de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) elige como diana el hígado (Shimizu y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:881 (1997)).

Alternativamente, diversos ligandos de elección de diana pueden unirse a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hidratos de carbono, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas pueden modificarse con derivados de galactosil-lípido de tipo ramificado para elegir como diana receptores de asialoglicoproteínas (galactosa) que se expresan exclusivamente sobre la superficie de células del hígado (Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287 (1997); Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Similarmente, Wu y col., *Hepatology* 27:772 (1998), han mostrado que el marcado de liposomas con asialofetuína condujo a una semivida acortada en plasma de liposomas y potenció enormemente la captación de liposoma marcado con asialofetuína por hepatocitos. Por otra parte, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosil-lípido de tipo ramificado puede inhibirse mediante preinyección de asialofetuína (Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Los liposomas de albúmina de suero humana poliacetonilados proporcionan otro enfoque para elegir como diana liposomas para células del hígado (Kamps y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:11681 (1997)). Además, Geho y col., patente de EE.UU. n° 4.603.044, describen un sistema de administración de vesículas dirigido a hepatocitos que tiene especificidad por receptores hepatobiliares asociados a las células metabólicas especializadas del hígado.

En un enfoque más general para elegir como diana tejido, las células diana están premarcadas con anticuerpos biotinilados específicos para un ligando expresado por la célula diana (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)). Después de la eliminación del plasma del anticuerpo libre se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otro enfoque, los anticuerpos que eligen diana se unen directamente a liposomas (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)).

Las proteínas de TACI-inmunoglobulina pueden encapsularse dentro de liposomas usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas (véanse, por ejemplo, Anderson y col., *Infect. Immun.* 31:1099 (1981), Anderson y col., *Cancer Res.* 50:1853 (1990) y Cohen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95 (1991), Alving y col., "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies" en *Liposome Technology*, 2ª edición, vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef y col., *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987)). Como se ha observado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener una variedad de componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados de lípidos de poli(etilenglicol) (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

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

intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:167 (1997)).

La presente memoria descriptiva describe proteínas de TACI-inmunoglobulina químicamente modificadas en las que el polipéptido está ligado a un polímero, como se ha tratado anteriormente.

5 Los expertos en la materia pueden idear otras formas farmacéuticas como se muestra, por ejemplo, por Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5ª edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª edición (Mack Publishing Company 1995), y por Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

10 Como ilustración, las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse como un kit que comprende un recipiente que comprende una proteína de TACI-inmunoglobulina. Los polipéptidos terapéuticos pueden proporcionarse en forma de una disolución inyectable para dosis únicas o múltiples, o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Alternativamente, un kit tal puede incluir un dispersador de polvo seco, generador de aerosol líquido o nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico. Un kit tal puede comprender adicionalmente información por escrito sobre las indicaciones y uso de la composición farmacéutica. Además, tal información puede incluir un comunicado de que la composición de proteína de TACI-inmunoglobulina está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a tanto el resto del receptor de TACI como el resto de inmunoglobulina.

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

20 La presente memoria descriptiva describe el uso de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina para proporcionar estas proteínas de fusión a un sujeto en necesidad de tal tratamiento. Para uso terapéutico veterinario o uso terapéutico humano, tales moléculas de ácido nucleico pueden administrarse a un sujeto que tiene un trastorno o enfermedad, como se ha tratado anteriormente. Como un ejemplo tratado anteriormente, las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina pueden usarse para tratamiento a largo plazo de lupus eritematoso sistémico.

25 Hay numerosos enfoques para introducir un gen de TACI-inmunoglobulina a un sujeto, que incluyen el uso de células huésped recombinantes que expresan TACI-inmunoglobulina, administración de ácido nucleico desnudo que codifica TACI-inmunoglobulina, uso de un vehículo de lípido catiónico con una molécula de ácido nucleico que codifica TACI-inmunoglobulina y el uso de virus que expresan TACI-inmunoglobulina, tal como retrovirus recombinantes, virus adenoasociados recombinantes, adenovirus recombinantes y virus del herpes simple recombinantes (véanse, por ejemplo, Mulligan, *Science* 260:926 (1993), Rosenberg y col., *Science* 242:1575 (1988), LaSalle y col., *Science* 259:988 (1993), Wolff y col., *Science* 247:1465 (1990), Breakfield y Deluca, *The New Biologist* 3:203 (1991)). En un enfoque *ex vivo*, por ejemplo, las células se aíslan de un sujeto, se transfectan con un vector que expresa un gen de TACI-inmunoglobulina y luego se trasplantan al sujeto.

35 Con el fin de efectuar la expresión de un gen de TACI-inmunoglobulina se construye un vector de expresión en el que una secuencia de nucleótidos que codifica un gen de TACI-inmunoglobulina está operativamente ligado a un promotor mínimo, y opcionalmente un elemento regulador, para controlar la transcripción génica. Los requisitos generales de un vector de expresión se han descrito anteriormente.

40 Alternativamente, un gen de TACI-inmunoglobulina puede administrarse usando vectores víricos recombinantes que incluyen, por ejemplo, vectores adenovíricos (por ejemplo, Kass-Eisler y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:11498 (1993), Kolls y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:215 (1994), Li y col., *Hum Gene Ther.* 4:403 (1993), Vincent y col., *Nat. Genet.* 5:130 (1993) y Zabner y col., *Cell* 75:207 (1993)), vectores de virus asociados a adenovirus (Flotte y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:10613 (1993)), alfa-virus tales como el virus del bosque Semliki y el virus Sindbis (Hertz y Huang, *J. Vir.* 66:857 (1992), Raju y Huang, *J. Vir.* 65:2501 (1991) y Xiong y col., *Science* 243:1188 (1989)), vectores de virus del herpes (por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.769.331, 4.859.587, 5.288.641 y 5.328.688), vectores de parvovirus (Koering y col., *Hum. Gene Therap.* 5:457 (1994)), vectores de poxvirus (Ozaki y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193:653 (1993), Panicali y Paoletti, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 79:4927 (1982)), poxvirus tales como poxvirus del canario o virus de la variolovacuna (Fisher-Hoch y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:317 (1989) y Flexner y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86 (1989)) y retrovirus (por ejemplo, Baba y col., *J. Neurosurg* 79:729 (1993), Ram y col., *Cancer Res.* 53:83 (1993), Takamiya y col., *J. Neurosci. Res* 33:493 (1992), Vile y Hart, *Cancer Res.* 53:962 (1993), Vile y Hart, *Cancer Res.* 53:3860 (1993) y Anderson y col., patente de EE.UU. nº 5.399.346). Dentro de diversas realizaciones puede utilizarse tanto el propio vector vírico como una partícula vírica que contiene el vector vírico en los procedimientos y composiciones descritos más adelante.

55 Como ilustración de un sistema, el adenovirus, un virus de ADN bicatenario, es un vector de transferencia de genes bien caracterizado para la administración de una molécula de ácido nucleico heteróloga (para una revisión véanse Becker y col., *Meth Cell Biol.* 43:161 (1994); Douglas y Curiel, *Science & Medicine* 4:44 (1997)). El sistema de adenovirus ofrece varias ventajas que incluyen: (i) la capacidad de acomodar insertos de ADN relativamente grandes, (ii) la capacidad de cultivar a alto título, (iii) la capacidad de infectar una amplia gama de tipos de células de mamífero y (iv) la capacidad de usarse con muchos promotores diferentes que incluyen promotores ubicuos, específicos de tejido y regulables. Además, los adenovirus pueden administrarse mediante inyección intravenosa, debido a que los virus son estables en la circulación sanguínea.

Usando vectores de adenovirus en los que las porciones del genoma del adenovirus están delecionadas, los insertos se incorporan en el ADN vírico por ligación directa o por recombinación homóloga con un plásmido cotransfectado. En un sistema a modo de ejemplo, el gen E1 esencial está delecionado del vector vírico, y el virus no se replicará a menos que el gen E1 sea proporcionado por la célula huésped. Si se administra intravenosamente a animales intactos, el adenovirus elige principalmente el hígado como diana. Aunque un sistema de administración adenovírico con una deleción del gen E1 no puede replicarse en las células huésped, el tejido de huésped expresará y procesará una proteína heteróloga codificada. Las células huésped también secretarán la proteína heteróloga si el gen correspondiente incluye una secuencia señal secretora. Las proteínas secretadas entrarán en la circulación a partir del tejido que expresa el gen heterólogo (por ejemplo, el hígado altamente vascularizado).

Además, los vectores adenovíricos que contienen diversas deleciones de genes víricos pueden usarse para reducir o eliminar respuestas inmunitarias al vector. Tales adenovirus están delecionados en E1, y además contienen deleciones de E2A o E4 (Lusky y col., *J. Virol.* 72:2022 (1998); Raper y col., *Human Gene Therapy* 9:671 (1998)). También se ha informado que la deleción de E2b reduce respuestas inmunitarias (Amalfitano y col., *J. Virol.* 72:926 (1998)). Delecionando todo el genoma del adenovirus pueden acomodarse insertos muy largos de ADN heterólogo. La generación de los llamados adenovirus “cobardes”, en los que todos los genes víricos están delecionados, son particularmente ventajosos para la inserción de grandes insertos de ADN heterólogo (para una revisión véase Yeh. y Perricaudet, *FASEB J.* 11:615 (1997)).

Pueden obtenerse cepas de alto título de virus recombinantes que pueden expresar un gen terapéutico a partir de células de mamífero infectadas usando procedimientos convencionales. Por ejemplo, el virus del herpes simple recombinante puede prepararse en células Vero como se describe por Brandt y col., *J. Gen. Virol.* 72:2043 (1991), Herold y col., *J. Gen. Virol.* 75:1211 (1994), Visalli y Brandt, *Virology* 185:419 (1991), Grau y col., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30:2474 (1989), Brandt y col., *J. Virol. Meth.* 36:209 (1992) y por Brown y MacLean (eds.), *HSV Virus Protocols* (Humana Press 1997).

Alternativamente, un vector de expresión que comprende un gen de TACI-inmunoglobulina puede introducirse en una célula de sujeto por lipofección *in vivo* usando liposomas. Pueden usarse lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador (Felgner y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 84:7413 (1987); Mackey y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:8027 (1988)). El uso de lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* tiene ciertas ventajas prácticas. Los liposomas pueden usarse para dirigir la transfección a tipos de células particulares, que es particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular tal como el páncreas, hígado, riñón y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas con el fin de marcado. Los péptidos (por ejemplo, hormonas o neurotransmisores), proteínas tales como anticuerpos o moléculas de no péptido elegidos como diana pueden acoplarse químicamente a liposomas.

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

En general, la dosificación de una composición que comprende un vector terapéutico que tiene una secuencia de ácidos de nucleótido de TACI-inmunoglobulina tal como un virus recombinante variará dependiendo de factores tales como la edad del sujeto, peso, altura, sexo, condición médica general e historia médica previa. Vías de administración adecuadas de vectores terapéuticos incluyen inyección intravenosa, inyección intraarterial, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección intratumoral e inyección en una cavidad que contiene un tumor. Como ilustración, Horton y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 96: 1553 (1999), demostraron que la inyección intramuscular de ADN de plásmido que codifica interferón α produce potentes efectos antitumorales sobre tumores primarios y metastásicos en un modelo murino.

Una composición que comprende vectores víricos, vectores no víricos o una combinación de vectores víricos y no víricos de la presente invención puede formularse según procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por lo que los vectores o virus se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se observa anteriormente, se dice que una composición, tal como solución salina tamponada con fosfato, es un “vehículo farmacéuticamente aceptable” si su administración puede ser tolerada por un sujeto receptor. Otros vehículos adecuados son muy conocidos para aquellos expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 19ª ed. (Mack Publishing Co. 1995) y Gilman's *the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7ª ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)).

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

Si el sujeto tratado con un vector de expresión génica terapéutico o un virus recombinante es un ser humano, entonces la terapia es preferentemente terapia génica de células somáticas. Es decir, el tratamiento preferido de un ser humano con un vector de expresión génica terapéutico o un virus recombinante no conlleva introducir en células una molécula de ácido nucleico que pueda formar parte de una línea germinal humana y pasarse a generaciones sucesivas (es decir, terapia génica de la línea germinal humana).

10. Producción de ratones transgénicos

Pueden manipularse ratones transgénicos para expresar en exceso secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina en todos los tejidos, o bajo el control de un elemento regulador específico de tejido o preferido por tejido. Estos productores en exceso de proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina pueden usarse para caracterizar el fenotipo que resulta de la expresión en exceso, y los animales transgénicos pueden servir de modelos para enfermedad humana producida por la proteína del receptor de TACI en exceso. Los ratones transgénicos que expresan en exceso proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina también proporcionan biorreactores modelo para la producción de proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina en la leche o sangre de animales más grandes. Los procedimientos para producir ratones transgénicos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Jacob, "Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice" en *Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice*, Jacob (ed.), páginas 111-124 (Academic Press, Ltd. 1994), Monastersky y Robl (eds.), *Strategies in Transgenic Animal Science* (ASM Press 1995) y Abbud y Nilson, "Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice" en *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*, Fernandez y Hoeffler (eds.), páginas 367-397 (Academic Press, Inc. 1999)).

Por ejemplo, un procedimiento para producir un ratón transgénico que expresa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina puede empezar con machos fértiles adultos (sementales) (B6C3f1, 2 a 8 meses de edad (Taconic Farms, Germantown, NY)), machos vasectomizados (estériles) (B6D2f1, 2 a 8 meses, (Taconic Farms)), hembras fértiles prepubescentes (donantes) (B6C3f1, 4 a 5 semanas, (Taconic Farms)) y hembras fértiles adultas (receptoras) (B6D2f1, 2 a 4 meses, (Taconic Farms)). Los donantes se aclimatan durante una semana y luego se inyectan LP con aproximadamente 8 UI/ratón de gonadotropina de suero de yegua preñada (Sigma Chemical Company; St. Louis, MO) y, 46-47 horas después, 8 UI/ratón de gonadotropina coriónica humana (hCG (Sigma)) I.P. para inducir superovulación. Los donantes se aparean con sementales posteriormente a las inyecciones de hormona. La ovulación se produce generalmente en el plazo de 13 horas desde la inyección con hCG. La copulación se confirma por la presencia de un tapón vaginal a la mañana siguiente al apareamiento.

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

Diez a veinte microgramos de ADN de plásmido que contiene una secuencia codificante de proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina se linealizan, se purifican en gel y se resuspenden en Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 0,25 mM (pH 8,0), a una concentración final de 5-10 nanogramos por microlitro para microinyección. Por ejemplo, las secuencias codificantes de proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina pueden codificar un polipéptido de TACI con delección de los residuos de aminoácidos 1 a 29 y 111 a 154 de SEC ID N°: 2, y un resto de inmunoglobulina Fc5.

El ADN de plásmido es microinyectado en óvulos recolectados contenidos en una gota de medio W640 revestido de aceite mineral equilibrado con CO₂ caliente. El ADN entra en una aguja de inyección (sacada de un capilar de vidrio de 0,75 mm de DI, 1 mm de DE de borosilicato vidrio) y se inyecta en óvulos individuales. Cada óvulo es penetrado con la aguja de inyección, en uno o los dos pronúcleos haploides.

Los picolitros de ADN se inyectan en los pronúcleos y la aguja de inyección se extrae sin ponerse en contacto con los nucléolos. El procedimiento se repite hasta que se inyectan todos los óvulos. Los óvulos satisfactoriamente microinyectados se transfieren a una placa de cultivo de tejido de órgano con medio W640 previamente gasificado para el almacenamiento durante la noche en una estufa de incubación a 37°C/5% de CO₂.

Al día siguiente, los embriones de dos células se transfieren a receptoras pseudopreñadas. Los receptoras se identifican por la presencia de tapones de copulación, después de copular con estériles vasectomizados. Los receptoras se anestesian y se rasuran sobre el lado izquierdo dorsal y se transfieren a un microscopio quirúrgico. Se hace una pequeña incisión en la piel y por la pared del músculo en el centro del área abdominal trazada por la caja torácica, la montura y la pata trasera, a mitad de camino entre la rodilla y el bazo. Los órganos reproductores se extraen del cuerpo sobre un pequeño paño quirúrgico. La bola adiposa se estira sobre el paño quirúrgico, y una grapilla para bebés (Roboz, Rockville, MD) se une a la bola adiposa y se deja colgando sobre la espalda del ratón, previniendo que los órganos se deslicen de nuevo.

Con una fina pipeta de transferencia que contiene aceite mineral seguido de alternar W640 y burbujas de aire, 12-17 embriones de dos células sanos de la inyección del día previo se transfieren al receptor. Se localiza la ampolla hinchada y sujetando el oviducto entre la ampolla y la bolsa se hace una hendidura en el oviducto con una aguja de 28 g próxima a la bolsa, asegurándose de no rasgar la ampolla o la bolsa.

- 5 La pipeta se transfiere a la hendidura en el oviducto, y los embriones se hinchan, dejando que la primera burbuja de aire escape de la pipeta. La bola adiposa se empuja suavemente en el peritoneo, y se deja que los órganos reproductores se deslicen dentro. La pared peritoneal se cierra con una sutura y la piel se cierra con un clip para heridas. Los ratones se recuperan en un calentador de portaobjetos a 37°C durante un mínimo de cuatro horas.

- 10 Los receptores se devuelven a las jaulas en pares y se dejan 19-21 días de gestación. Después del nacimiento se dejan 19-21 días después del parto antes del destete. Los animales destetados son sexados y se ubican en jaulas separadas por sexo y una biopsia de 0,5 cm (usada para el genotipado) se corta de la cola con tijeras limpias.

- 15 Se prepara ADN genómico a partir de los cortes de cola usando, por ejemplo, un kit QIAGEN DNEASY siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se analiza por PCR usando cebadores diseñados para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina o un gen del marcador de selección que se introdujo en el mismo plásmido. Después de confirmarse que los animales eran transgénicos, se retrocruzan en una cepa endogámica colocando una hembra transgénica con un macho natural, o un macho transgénico con una o dos hembras naturales. Cuando nacen las crías y se destetan, los sexos se separan y sus colas se cortan para el genotipado.

- 20 Para comprobar la expresión de un transgén en un animal vivo se realiza una hepatectomía parcial. Se hace una preparación del campo quirúrgico del abdomen superior directamente por debajo de la apófisis xifoides. Usando técnica estéril se hace una pequeña incisión de 1,5-2 cm debajo del esternón y el lóbulo lateral izquierdo del hígado se extrae del cuerpo. Usando seda 4-0 se hace un lazo alrededor del lóbulo inferior asegurándolo fuera de la cavidad del cuerpo. Se usa una pinza atraumática para sujetar el lazo mientras que un segundo bucle de Dexon absorbible (American Cyanamid; Wayne, N.J.) se coloca proximal al primer lazo. Se hace un corte distal a partir del lazo Dexon y aproximadamente 100 mg del tejido de hígado extirpado se colocan en una placa de petri estéril. La sección de hígado extirpada se transfiere a un tubo de fondo redondo de polipropileno de 14 ml y se congela criogénicamente en nitrógeno líquido y luego se guarda sobre nieve carbónica. El sitio quirúrgico se cierra con sutura y clips para heridas y la jaula del animal se sitúa sobre una almohadilla de calentamiento a 37°C durante 24 horas posoperativamente. El animal se comprueba diariamente posoperativamente y los clips para heridas se quitan 7-10 días después de la cirugía. El nivel de expresión de ARNm de proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina se examina para cada ratón transgénico usando un ensayo de hibridación en disolución de ARN o reacción en cadena de la polimerasa.

- 35 Usando el enfoque general descrito anteriormente se han producido ratones transgénicos que expresan niveles significativos de proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina en leche. En este caso particular, la secuencia codificante de la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina codificó un polipéptido de TACI con delección de los residuos de aminoácidos 1 a 29 y 111 a 154 de SEC ID N°: 2, y un resto de inmunoglobulina Fc5.

Por tanto, la presente invención, generalmente descrita, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1

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

- Las moléculas de ácido nucleico que codifican TACI humano se obtuvieron durante la clonación por expresión de los receptores para ZTNF4 como se describe por Gross y col., Nature 404:995 (2000). Las secuencias codificantes contenidas en las construcciones de expresión de TACI-Fc se generaron por PCR de solapamiento usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Horton y col., Gene 77:61 (1989)). Se usaron ADNc de TACI humano y ADNc de Fc como moldes de partida para las amplificaciones por PCR. Los cebadores de PCR se diseñaron para dar los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante deseados y para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para facilitar la inserción de estas secuencias codificantes en los vectores de expresión. Las secuencias codificantes de TACI-Fc se insertaron en vectores de expresión que indujeron un gen de dihidrofolato-reductasa murino funcional. Un vector de expresión también contuvo un promotor del citomegalovirus para dirigir la expresión del transgén de la proteína recombinante, un intrón de inmunoglobulina, una secuencia señal del activador tisular del plasminógeno, una secuencia de entrada ribosómica interna, un cistrón CD8 delecionado para la selección superficial de células transfectadas y elementos de expresión en levadura para el crecimiento del plásmido en células de levadura.

- 55 Un enfoque que se usó para producir proteínas de fusión TACI-Fc se ilustra mediante el procedimiento usado para la construcción de TACI-Fc4. Otras proteínas de fusión de TACI-Fc se produjeron insertando secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de fusión de TACI-Fc en un vector de expresión de mamífero, e introduciendo ese vector de expresión en células de mamífero.

A. Construcción de fragmentos de Fc4 de Ig γ 1

Para preparar la proteína de fusión de TACI-Fc4, la región Fc de IgG1 humana (la región bisagra y los dominios CH₂ y CH₃) se modificó para eliminar el receptor de Fc γ 1 (Fc γ RI) y las funciones de unión a complemento (C1q). Esta versión modificada de Fc de IgG1 humana se designó "Fc4".

5 La región Fc se aisló de una PCR de la biblioteca de hígado fetal humano (Clontech) usando los cebadores de oligonucleótidos 5' ATCAGCGGAA TTCAGATCTT CAGACAAAAC TCACACATGC CCAC 3' (SEC ID N°: 7) y 5' GGCAGTGCCT AGATCATTTA CCCG-GAGACA GGGAG 3' (SEC ID N°: 8). Las mutaciones dentro de la región Fc se introdujeron por PCR para reducir la unión a Fc γ RI. El sitio de unión a Fc γ RI (Leu-Leu-Gly-Gly; residuos de aminoácidos 38 a 41 de SEC N°: 6, que se corresponden con las posiciones de índice EU 234 a 237) se mutó a Ala-Glu-Gly-Ala para reducir la unión a Fc γ R1 (véanse, por ejemplo, Duncan y col., Nature 332:563 (1988); Baum y col., EMBO J. 13:3992 (1994)). Los cebadores de oligonucleótido 5' CCGTGCCCAG CACCTGAAGC CGAGGGGGCA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC C 3' (SEC ID N°: 9) y 5' GGATTCTAGA TTATTTACCC GGA-GACAGGG A 3' (SEC ID N°: 10) se usaron para introducir la mutación. A un volumen final de 50 μ l se añadieron 570 ng de molde de IgFc, 5 μ l de 10x tampón de reacción Pfu (Stratagene), 8 μ l de dNTP 1,25 mM, 31 μ l de agua destilada, 2 μ l de cebadores de oligonucleótidos 20 mM. Se añadió un volumen igual de aceite mineral y la reacción se calentó a 94°C durante 1 minuto. Se añadió Pfu polimerasa (2,5 unidades, Stratagene) seguido de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, seguido de una extensión de 7 minutos a 72°C. Los productos de reacción se fraccionaron por electroforesis y se detectó la banda correspondiente al tamaño predicho de aproximadamente 676 pares de bases. Esta banda se escindió del gel y se recuperó usando un kit de extracción en gel QIAGEN QIAquickTM (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

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

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

B. Construcción de vectores de expresión de TACI-Fc4

Se construyeron plásmidos de expresión que comprenden una región codificante para la proteína de fusión de TACI-Fc4 mediante recombinación homóloga en levadura. Un fragmento de ADNc de TACI se aisló usando PCR que incluyó la secuencia de polinucleótidos del nucleótido 14 al nucleótido 475 de SEC ID N°: 1. Los dos cebadores usados en la producción del fragmento de TACI fueron: (1) un cebador que contiene 40 pares de bases de la secuencia flanqueante del vector de 5' y 17 pares de bases correspondientes al extremo amino del fragmento de

5 TAC1 (5' CTCAGCCAGG AATCCATGC CGAGTTGAGA CGCTTCCGTA GAATGAGT-GG CCTGGGCCG 3'; SEC ID N°: 15); (2) 40 pares de bases del extremo 3' correspondientes a la secuencia de Fc4 flanqueante y 17 pares de bases correspondientes al extremo carboxilo del fragmento de TAC1 (5' GCATGTGTGA GTTTTGTCTG AAGATCTGGG CTCCTTCAGC CCCGGGAG 3', SEC ID N°: 16). A un volumen final de 100 µl se añadieron 10 ng de molde de TAC1, 10 µl de tampón de reacción de 10x Taq polimerasa (Perkin Elmer), 8 µl de dNTP 2,5 nM, 78 µl de agua destilada, 2 µl de cada una de las disoluciones madre 20 mM de los cebadores de oligonucleótido y Taq polimerasa (2,5 unidades, Life Technology). Se añadió un volumen igual de aceite mineral y la reacción se calentó a 94°C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, seguido de una extensión de 5 minutos a 72°C.

10 El fragmento que contenía el ADNc que codifica el fragmento Fc4 se construyó de un modo similar. Los dos cebadores usados en la producción del fragmento Fc4 fueron (en la dirección 5' y en la dirección 3') un cebador de oligonucleótidos que contiene 40 pares de bases de la secuencia flanqueante de TAC1 en 5' y 17 pares de bases correspondientes al extremo amino del fragmento Fc4 (5' GCACAGAGGC TCAGAAGCAA GTCCAGCTCT CCCGGGGCTG AAGGAGCCCA GATCTTCAGA 3'; SEC ID N°: 17); y un cebador de oligonucleótidos que contiene 40 pares de bases del extremo 3' correspondientes a la secuencia del vector flanqueante y 17 pares de bases correspondientes al extremo carboxilo del fragmento Fc4 (5' GGGGTGGGTA CAAC-CCCAGA GCTCTTTTAA TCTAGATTAT TTACCCGGAG ACAGGG 3'; SEC ID N°: 18). A un volumen final de 100 µl se añadieron 10 ng del molde de Fc4 descrito anteriormente, 10 µl de 10x tampón de reacción de Taq polimerasa (Perkin Elmer), 8 µl de dNTP 2,5 nM, 78 µl de agua destilada, 2 µl de cada una de las disoluciones madre 20 mM de los oligonucleótidos y Taq polimerasa (2,5 unidades, Life Technology). Se añadió un volumen igual de aceite mineral y la reacción se calentó a 94°C durante 2 minutos, luego 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, seguido de una extensión de 5 minutos a 72°C.

25 Se ejecutaron diez microlitros de cada uno de los 100 µl de reacciones de PCR descritos anteriormente sobre un gel de agarosa LMP al 0,8% (Seaplaque GTG) con 1x tampón TBE para análisis. El resto de los 90 µl de cada reacción de PCR se precipitó con la adición de 5 µl de cloruro sódico 1 M y 250 µl de etanol absoluto. El plásmido pZMP6 se escindió con *SmaI* para linealizarlo en el poliligador. El plásmido pZMP6 se derivó del plásmido pCZR199 (Colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA, ATCC n° 98668) y es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor temprano inmediato del citomegalovirus, un intrón consenso de la región variable del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes, un codón de terminación y un terminador de la hormona de crecimiento humano. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión del marcador de selección de mamífero que tiene un promotor, potenciador y origen de replicación de SV40, un gen de dihidrofolato-reductasa y el terminador de SV40. El vector pZMP6 se construyó a partir de pCZR199 por sustitución del promotor de la metalotioneína con el promotor temprano inmediato del citomegalovirus y las secuencias de Kozac en el extremo 5' del marco de lectura abierto.

35 Cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) se combinaron con 10 µl que contenían aproximadamente 1 µg del dominio extracelular de TAC1 y los fragmentos de PCR de Fc4, y 100 ng de vector pZMP6 digerido con *SmaI*, y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. Las mezclas de levadura/ADN se electropulsaron a 0,75 kV (5 kV/cm), ∞ ohm, 25 µF. A cada cubeta se añadieron 600 µl de sorbitol 1,2 M y la levadura se sembró en dos alícuotas de 300 µl sobre placas de URA-D y se incubaron a 30°C.

40 Después de aproximadamente 48 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una única placa se resuspendieron en 1 ml de agua y se centrifugaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento de células se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (2% de Triton X-100, 1% de SDS, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Se añadieron quinientos microlitros de la mezcla de lisis a un tubo Eppendorf que contenía 300 µl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 200 µl de fenol-cloroformo, se agitaron dos o tres veces con vórtex durante intervalos de 1 minuto, seguido de una centrifugación de 5 minutos en una centrífuga de Eppendorf a velocidad máxima. Trescientos microlitros de la fase acuosa se transfirieron a un tubo nuevo y el ADN se precipitó con 600 µl de etanol, seguido de centrifugación durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de ADN se resuspendió en 100 µl de agua.

50 La transformación de células *E. coli* electrocompetentes (DH10B, GibcoBRL) se realizó con 0,5-2 ml de preparación de ADN de levadura y 40 µl de células DH10B. Las células se electropulsaron a 2,0 kV, 25 mF y 400 ohm. Tras la electroporación, 1 ml de SOC (2% de Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, MI), 0,5% de extracto de levadura (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, 20 mM glucosa) se sembraron en alícuotas de 250 µl sobre cuatro placas LB AMP (caldo LB (Lennox), 1,8% de Bacto-Agar (Difco), 100 mg/l de ampicilina).

55 Los clones individuales que albergaban la correcta construcción de expresión para TAC1-Fc4 se identificaron por digestión por restricción para verificar la presencia del inserto y para confirmar que las diversas secuencias de ADN se habían unido correctamente entre sí. El inserto de clones positivos se sometió a análisis de secuencias. El ADN de plásmido a mayor escala se aísla usando el kit Qiagen Maxi (Qiagen) según instrucciones del fabricante.

C. Construcción de Fc5, Fc6 y Fc7

En Fc5, el residuo de Arg en la posición del índice EU 218 se cambió de nuevo a un residuo Lys. La Ig γ 1 humana natural contiene una lisina en esta posición. Brevemente, las moléculas de ácido nucleico que codifican Fc5 se produjeron usando los cebadores de oligonucleótidos 5' GAGCCCAAATCTTCAGACAAAACACTCACACATGCCCA 3' (SEC ID N°: 19) y 5' TAATT-GGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3' (SEC ID N°: 20). Las condiciones de la amplificación por PCR fueron del siguiente modo. A un volumen final de 50 μ l se añadieron 236 ng de molde de Fc4, 5 μ l de 10 x tampón de reacción Pfu (Stratagene), 4 μ l de dNTP 2,5 mM, 1 μ l de 20 μ M de cada uno de los oligonucleótidos y 1 μ l de Pfu polimerasa (2,5 unidades, Stratagene). El perfil de amplificación térmica consistió en 94°C durante 2 minutos, 5 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 42°C durante 20 segundos, 72°C durante 45 segundos, 20 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 72°C durante 1 minuto 20 segundos, seguido de una extensión de 7 minutos a 72°C. El producto de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa y se detectó la banda correspondiente al tamaño predicho de aproximadamente 718 pares de bases. La banda se escindió del gel y se recuperó usando un kit de extracción en gel QIAGEN QIAquick (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

Fc6 es idéntico a Fc5, excepto que se ha eliminado el codón de lisina del extremo carboxilo. Como en Fc4 y Fc5 anteriormente, el codón de terminación en la secuencia de Fc6 se cambió a TAA. Fc6 se generó a partir de ADN mensajero que codificó Fc5 usando los cebadores de oligonucleótidos 5' GAGCCCAAAT CTTCAGACAA AACTCACACA TGCCCA 3' (SEC ID N°: 19) y 5' GGCGCGCCTC TAGATTAACC CGGAGACAGGGAGAGGC 3' (SEC ID N°: 21).

Fc7 es idéntico a Fc de γ 1 natural, excepto por una sustitución de aminoácidos en la posición del índice EU Asn 297 localizada en el dominio C_{H2}. Asn 297 se mutó a un residuo de Gln para evitar la unión de hidrato de carbono ligado a N en esa posición de residuo. Como antes, el codón de terminación en la secuencia de Fc7 se cambió a TAA. Fc7 se generó por PCR de solapamiento usando un ADNc de Fc de IgG γ 1 humana natural como molde y los cebadores de oligonucleótidos 5' GAGCCCAAATCTT-GCGACAAAACACTCACA 3' (SEC ID N°: 22) y 5' GTACGTGCTTTGGTACTGCTCCTCCCGCGGCTT 3' (SEC ID N°: 23) para generar la mitad de 5' de Fc7, y los cebadores de oligonucleótidos 5' CAGTACCAAAGCACGTACCGTGTGGTCA 3' (SEC ID N°: 24) y 5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3' (SEC ID N°: 20) para generar la mitad de 3' de Fc7. Los dos productos de PCR se combinaron y se amplificaron usando los cebadores de oligonucleótidos 5' GAGCCCAAATCTT-GCGACAAAACACTCACA 3' (SEC ID N°: 22) y 5'TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3' (SEC ID N°: 20).

Todos los productos de PCR resultantes se purificaron en gel, se clonaron y se verificaron por análisis de secuencias de ADN.

D. Construcción de proteínas de fusión de TACI-Fc aminotruncadas

Se generaron cuatro versiones truncadas del extremo amino de TACI-Fc. Las cuatro tuvieron una secuencia señal del activador de plasminógeno de tejido humano modificada (SEC ID N°: 25) fusionada con el residuo de aminoácido número 30 de SEC ID N°: 2. Sin embargo, las cuatro proteínas se diferenciaron en la localización del punto en el que Fc5 se fusionó con la secuencia de aminoácidos de TACI de SEC ID N°: 2. La Tabla 3 resume las estructuras de las cuatro proteínas de fusión.

Tabla 3

Proteínas de fusión de TACI	
Designación de TACI-Fc	Residuos de aminoácidos de TACI
TACI (d1-29)-Fc5	30 a 154 de SEC ID N°: 2
TACI (d1-29, d107-154)-Fc5	30 a 106 de SEC ID N°: 2
TACI (d1-29, d111-154)-Fc5	30 a 110 de SEC ID N°: 2
TACI (d1-29, d120-154)-Fc5	30 a 119 de SEC ID N°: 2

Los casetes de expresión que codifican la proteína se generaron por PCR de solapamiento usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Horton y col., Gene 77:61 (1989)). Como moldes de PCR se usaron una molécula de ácido nucleico que codifica TACI y una molécula de ácido nucleico que codifica Fc5. Los cebadores de oligonucleótidos se identifican en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4

Cebadores de oligonucleótidos usados para producir proteínas de fusión de TACI				
Designación de TACI-Fc5	Designaciones de oligonucleótidos			
	5'TACI	3' TACI	5' Fc5	3'Fc5
TACI (d1-29)-Fc5	ZC24,903	ZC24,955	ZC24,952	C24,946
TACI (d1-29, d107-154)-Fc5	ZC24,903	ZC24,951	ZC24,949	ZC24,946
TACI (d1-29, d111-154)-Fc5	ZC24,903	ZC28,978	ZC28,979	ZC24,946
TACI (d1-29, d120-154)-Fc5	ZC24,903	ZC28,981	ZC28,980	ZC24,946

Tabla 5

Secuencias de oligonucleótidos		
Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEC ID Nº
ZC24,903	5' TATTAGGCCGCGCCACCATGGATGCAATGA 3'	40
ZC24,955	5'TGAAGATTTGGGCTCCTTGAGACCTGGGA3'	41
ZC24,952	5' TCCCAGGTCTCAAGGAGCCCAAATCTTCA 3'	42
ZC24,946	5' TAATTGGCGCGCGTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3'	20
ZC24,951	5' TGAAGATTTGGGCTCGTTCTCACAGAAGTA 3'	43
ZC24,949	5' ATACTTCTGTGAGAACGAGCCCAAATCTTCA 3'	44
ZC28,978	5'TTTGGGCTCGCTCCTGAGCTTGTCTCACA 3'	45
ZC28,979	5' CTCAGGAGCGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	46
ZC28,981	5' TTTGGGCTCCCTGAGCTCTGGTGGAA 3'	47
ZC28,980	5' GAGCTCAGGGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	48

5 La primera ronda de amplificaciones por PCR consistió en dos reacciones para cada una de las cuatro versiones truncadas del extremo amino. Las dos reacciones se realizaron por separado usando los oligonucleótidos de TACI de 5' y 3' en una reacción y los oligonucleótidos de Fc5 de 5' y 3' en otra reacción para cada versión. Las condiciones de la primera ronda de amplificación por PCR fueron del siguiente modo. A un volumen final 25 µl se añadieron aproximadamente 200 ng de ADN mensajero, 2,5 µl de 10 x tampón de reacción Pfu (Stratagene), 2 µl de dNTP 2,5 mM, 0,5 µl de 20 µM de cada oligonucleótido de 5' y oligonucleótido de 3' y 0,5 µl de Pfu polimerasa (2,5 unidades, Stratagene). El perfil de amplificación térmica consistió en 94°C durante 3 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 50°C durante 15 segundos, 72°C durante 2 minutos, seguido de una extensión de 2 minutos a 72°C. Los productos de reacción se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa, y las bandas correspondientes a los tamaños predichos se escindieron del gel y se recuperaron usando un kit de extracción en gel QIAGEN QIAQUICK (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

La segunda ronda de amplificación por PCR, o reacción de amplificación por PCR de solapamiento, se realizó usando los fragmentos purificado en gel de la primera ronda PCR como molde de ADN. Las condiciones de la segunda ronda de amplificación por PCR fueron del siguiente modo. A un volumen final 25 µl se añadieron aproximadamente 10 ng de ADN mensajero de cada uno del fragmento de TACI y del fragmento Fc5, 2,5 µl de 10 x tampón de reacción Pfu (Stratagene), 2 µl de dNTP 2,5 mM, 0,5 µl de 20 µM de cada uno de ZC24,903 (SEC ID Nº: 40) y ZC24,946 (SEC ID Nº: 20) y 0,5 µl de Pfu polimerasa (2,5 unidades, Stratagene). El perfil de amplificación térmica consistió en 94°C durante 1 minuto, 35 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos, 72°C durante 2 minutos, seguido de una extensión de 2 minutos a 72°C. Los productos de reacción se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa, y las bandas correspondientes a los tamaños predichos se escindieron del gel y se recuperaron usando un kit de extracción en gel QIAGEN QIAQUICK (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

Cada una de las cuatro versiones de los productos de PCR de TACI-Fc truncadas del extremo amino se clonaron por separado usando el kit de clonación ZEROBLUNT TOPO PCR de Invitrogen siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La Tabla 6 identifica las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de estas construcciones de TACI-Fc.

5

Tabla 6

Secuencias de variantes de TACI-Fc		
Designación de TACI-Fc	SEC ID Nº	
	Nucleótido	Aminoácido
TACI (d1-29)-Fc5	49	50
TACI (d1-29, d107-154)-Fc5	51	52
TACI (d1-29, d111-154)-Fc5	53	54
TACI (d1-29, d120-154)-Fc5	55	56

Después de identificarse las secuencias de nucleótidos, los plásmidos que comprendían cada una de las cuatro versiones de las fusiones de TACI-Fc truncadas del extremo amino se digirieron con *FseI* y *AsclI* para eliminar los segmentos que codificaban aminoácidos. Los fragmentos de *FseI* - *AsclI* se ligaron a un vector de expresión de mamífero que contenía un promotor del CMV y un segmento poli A de SV40. Los vectores de expresión se introdujeron en células de ovario de hámster chino como se describe más adelante.

10

Ejemplo 2

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

15

20

Las construcciones de expresión de TACI-Fc se usaron para transfectar, por electroporación, células DG44 de ovario de hámster chino (CHO) adaptadas en suspensión cultivadas en medio libre de proteínas animales (Urlaub y col., Sam. Cell. Molec. Genet. 12:555 (1986)). Las células DG44 de CHO carecen de un gen de dihidrofolato-reductasa funcional debido a deleciones en ambas localizaciones cromosómicas de la dihidrofolato-reductasa. El crecimiento de las células en presencia de concentraciones elevadas de metotrexato produce la amplificación del gen de dihidrofolato-reductasa y el gen codificado por la proteína recombinante ligada sobre la construcción de expresión.

25

30

Las células DG44 de CHO se sometieron a pases en medio PFCHO (JRH Biosciences, Lenexa, KS), L-glutamina 4 mM (JRH Biosciences) y 1x suplemento de hipertanxina-timidina (Life Technologies), y las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ en matraces con agitación Corning a 120 rpm en una plataforma de agitación rotatoria. Las células se transfectaron por separado con plásmidos de expresión linealizados. Para garantizar la esterilidad se realizó una única etapa de precipitación con etanol sobre hielo durante 25 minutos combinando 200 µg de ADN de plásmido en un tubo de Eppendorf con 20 µl de ADN de vehículo de esperma de salmón cortado (5' → 3' Inc. Boulder, CO, 10 mg/ml), 22 µl de NaOAc 3 M (pH 5,2) y 484 µl de etanol al 100% (Gold Shield Chemical Co., Hayward, CA). Después de la incubación, el tubo se centrifugó a 14.000 rpm en una microcentrifuga dispuesta en una habitación fría a 4°C, el sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó dos veces con 0,5 ml de etanol al 70% y se dejó que se secase al aire.

35

Las células DG44 de CHO se prepararon mientras que el sedimento de ADN se secaba centrifugando 10⁶ células totales (16,5 ml) en un tubo de centrifuga cónico de 25 ml a 900 rpm durante 5 minutos. Las células DG44 de CHO se resuspendieron en un volumen total de 300 µl de medio de crecimiento PFCHO y se dispusieron en una cubeta Gene-Pulser con una separación entre electrodos de 0,4 cm (Bio-Rad). El ADN, después de aproximadamente 50 minutos de tiempo de secado, se resuspendió en 500 µl de medio de crecimiento PFCHO y se añadió a las células en la cubeta de manera que el volumen total no superara 800 µl y se dejó que se asentaran a temperatura ambiente durante 5 minutos para disminuir la formación de burbujas. La cubeta se colocó en una unidad BioRad Gene Pulser II a 0,296 kV (kilovoltios) y 0,950 AC (alta capacitancia) y se electroporó inmediatamente.

40

Las células se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente antes de disponerse en 20 ml de volumen total de medio PFCHO en un matraz T-75 de CoStar. El matraz se colocó a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas cuando entonces las células se contaron por hemocitómetro utilizando exclusión con azul de tripano y se dispusieron en medio de selección PFCHO sin suplemento de hipertanxina-timidina y que contenía metotrexato 200 mM (Cal Biochem).

Tras la recuperación del procedimiento de selección con metotrexato, el medio acondicionado que contenía las proteínas de TACI-Fc secretadas se examinó por análisis de transferencia Western.

Ejemplo 3**Análisis estructural de proteínas de TACI-Fc**

En ciertos casos, las proteínas de fusión TACI-Fc se purificaron parcialmente antes del análisis. El medio acondicionado de cultivos de ovario de hámster chino se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 μm y la proteína de TACI-Fc se capturó sobre una columna de proteína A. El material unido a la proteína A se eluyó y se pasó sobre una columna de exclusión de tamaño S-200 para la purificación final.

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

Los análisis de las secuencias de aminoácidos del extremo amino se realizaron en sistemas secuenciadores de proteínas modelos 476A y 494 de Perkin Elmer Applied Biosystems Division (Foster City, CA). Los análisis de datos se realizaron con el sistema de análisis de datos modelo 610A de Applied Biosystems para la secuenciación de proteínas, versión 2.1a (Applied Biosystems, Inc.). La mayoría de los proveedores y reactivos usados fueron de Applied Biosystems, Inc.

Ejemplo 4**Análisis funcional de proteínas de TACI-Fc**

Se usaron dos enfoques para examinar las características de unión de cuatro proteínas de TACI-Fc a ZTNF4. Un enfoque midió la capacidad de las construcciones de TACI-Fc para competir con las placas recubiertas con TACI por la unión de ZTNF4 marcado con ^{125}I . En el segundo enfoque, concentraciones crecientes de ZTNF4 marcado con ^{125}I se incubaron con cada una de las construcciones de TACI-Fc, y se determinó la radiactividad asociada a los complejos de ZTNF4-TACI-Fc precipitados. Las proteínas de fusión de TACI-Fc tuvieron restos de TACI que carecieron de los 29 primeros residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N^o: 2. Una de las proteínas de fusión tuvo un resto de TACI con una región del tallo intacta (TACI (d1-29)-Fc5), mientras que tres de las proteínas de fusión de TACI-Fc tuvieron restos de TACI con diversas deleciones en la región del tallo (TACI (d1-29, d107-154)-Fc5; TACI (d1-29, d111-154)-Fc5; TACI (d1-29, d120-154)-Fc5).

A. Ensayo de unión competitivo

ZTNF4 se radioyodó con perlas de yodo (Pierce) siguiendo procedimientos convencionales. Brevemente, 50 μg de ZTNF4 se yodaron con 4 mCi de ^{125}I usando una única perla de yodo. La reacción se inactivó con una disolución de albúmina de suero bovino al 0,25% y el ^{125}I libre se eliminó por filtración en gel usando una columna PD-10 (Pierce). La radiactividad específica de preparaciones de ^{125}I -ZTNF4 se determinó por precipitación con ácido tricloroacético antes y después de la etapa de desalación.

Un fragmento del extremo N del receptor de TACI, designado "TACI-N", se añadió a placas de 96 pocillos (100 μl a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron, se bloquearon con Superblock (Pierce) y se lavaron de nuevo. Las construcciones de TACI-Fc, a diversas concentraciones que oscilan de 0 a 11,5 ng/ml, se mezclaron con una concentración fija de ^{125}I -ZTNF4 (20 ng/ml) y se incubaron durante 2 horas a 37°C sobre la placa recubierta con TACI-N. Lo controles contuvieron tanto TACI-N en disolución como carecieron de TACI-Fc. Después de la incubación, las placas se lavaron y se contaron. Cada determinación se realizó por triplicado.

Los resultados mostraron que todas las construcciones de TACI-Fc inhibieron completamente la unión de ^{125}I -ZTNF4 a concentraciones de aproximadamente 100 ng/ml o superiores. Las proteínas de TACI-Fc, TACI (d1-29)-Fc5, TACI (d1-29, d111-154)-Fc5 y TACI (d1-29, d120-154)-Fc5 fueron inhibidores más eficaces que la construcción de TACI-Fc, TACI (d1-29, d107-154)-Fc5. Un fragmento Fc solo no inhibió la unión. Los valores de CI_{50} se calcularon para cada construcción en tres experimentos. Los valores promedio para las construcciones fueron: TACI (d1-29)-Fc5: 2,07 nM; TACI (d1-29, d107-154)-Fc5: 4,95 nM; TACI (d1-29, d111-154)-Fc5: 2,31 nM; y TACI (d1-29, d120-154)-Fc5: 2,21 nM.

B. Ensayo de unión en disolución

A una concentración de 0,05 nM, cada construcción de TACI-Fc se incubó con ^{125}I -ZTNF4 0,4 pM a 1,5 nM durante 30 minutos a temperatura ambiente en un volumen total de 0,25 ml/tubo. Se añadió una suspensión de Pansorbin (Staph A) a cada tubo y después de 15 minutos las muestras se centrifugaron, se lavaron dos veces y los sedimentos se contaron. La unión no específica se determinó mediante la adición de ZTNF4 sin marcar 130 nM a la mezcla de ^{125}I -ZTNF4/TACI-Fc. La unión específica se calculó restando las cpm unidas en presencia de ZTNF4 sin marcar de las cpm totales unidas a cada concentración de ^{125}I -ZTNF4. Cada determinación se realizó por triplicado. Las constantes de unión se calcularon usando el software Graph-Pad Prism (MacIntosh v. 3.0).

La Figura 4 ilustra la unión específica de ^{125}I -ZTNF4 a las diversas construcciones de TACI-Fc. Pareció que la unión se aproximaba a la saturación con cada construcción, y fue significativamente mayor para las construcciones TACI (d1-29)-Fc5, TACI (d1-29, d111-154)-Fc5, TACI (d1-29, dT20-154)-Fc5 en comparación con la unión de TACI (d1-29, d107-154)-Fc5. Se calcularon los valores de $B_{\text{máx}}$ y K_d , y los resultados se resumen en la Tabla 7.

5

Tabla 7

Unión de ^{125}I -ZTNF4 a construcciones de TACI-Fc		
Construcción de TACI-Fc	K_d (nM)	$B_{\text{máx}}$ (nM)
TACI (d1-29)-Fc5	0,134	0,023
TACI (d1-29, d107-154)-Fc5	0,121	0,010
TACI (d1-29, d111-154)-Fc5	0,115	0,018
TACI (d1-29, d120-154)-Fc5	0,092	0,021

Ejemplo 5

Medición de ZTNF4 en circulación

Los niveles de ZTNF4 en individuos con una afección por enfermedad (tal como, por ejemplo, LES, artritis reumatoide) con respecto a individuos normales se determinaron usando un ensayo de electroquimioluminiscencia. Una curva estándar preparada a partir de ZTNF4 humano soluble a 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,01 ng/ml y 0 ng/ml se preparó en tampón ORIGIN (Igen, Gaithersburg, MD). Las muestras de suero se diluyeron en tampón ORIGIN. Los patrones y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas con anticuerpo de conejo dirigido contra ZTNF4-NF BV humano biotinilado diluido a 1 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de ensayo Origin (IGEN) y anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra ZTNF4-NF BV humano diluido a 1 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de ensayo Origin (IGEN). Tras la incubación, las muestras se agitaron con vórtex y se añadieron 0,4 mg/ml de estreptavidina Dynabeads (Dyna, Oslo, Noruega) a cada uno de los patrones y las muestras a 50 μl /tubo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces, las muestras se agitaron con vórtex y las muestras se leyeron en un analizador Origin (Igen) según las instrucciones del fabricante. El ensayo Origin se basa en electroquimioluminiscencia y produce una lectura en ECL. En un estudio se detectó un nivel elevado de ZTNF4 en las muestras de suero de ratones tanto NZBWF1/J como MRI/Mpj-Fas^{1pr}, que han avanzado a fases avanzadas de glomerulonefritis y enfermedad autoinmunitaria.

El ENSAYO ORIGIN también se usó para medir niveles de ZTNF4 en la sangre de pacientes con LES con respecto a niveles en circulación en individuos normales. Una curva estándar preparada a partir de ZTNF4 humano soluble a 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,01 ng/ml y 0 ng/ml se preparó en tampón ORIGIN (Igen). Todas las muestras de paciente se ejecutaron por triplicado con un volumen final de 25 μl . Los patrones y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas con un anticuerpo de captura, anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra ZTNF4-NF BV humano biotinilado, diluido a 1 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de ensayo Origin (IGEN) y un anticuerpo de detección, anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra ZTNF4-NF BV humano rutenilado, diluido a 1 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de ensayo Origin (IGEN). Tras la incubación, las muestras se agitaron con vórtex y se añadieron 0,4 mg/ml de estreptavidina Dynabeads (Dyna) a cada uno de los patrones y las muestras a 50 μl /tubo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces, las muestras se agitaron con vórtex y se analizaron usando un analizador Origin 1.5 (Igen) según las instrucciones del fabricante.

Este ensayo incluyó 28 muestras de control normales y muestras de 20 pacientes diagnosticados con LES. Se observaron niveles elevados de ZTNF4 en el suero de pacientes diagnosticados con LES en comparación con donantes de suero de control normal. Los niveles de ZTNF4 se calcularon como un aumento en veces de niveles de ZTNF4 en las muestras de paciente o de control con respecto a una muestra de suero de referencia humana arbitraria. El promedio de las 28 muestras de control fue 1,36 veces con respecto a la muestra de referencia humana y el promedio de las 20 muestras de pacientes con LES fue 4,92. Siete de los 20 pacientes con LES tuvieron niveles de ZTNF4 que estuvieron dos veces por encima del promedio de las muestras de control, mientras que sólo hubo un individuo de control que tuvo un nivel superior a dos veces con respecto al promedio de control.

La memoria descriptiva describe a continuación la realización R1 a la realización R44:

R1. El uso de una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación de células tumorales, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

45

- 5 (a) un resto del receptor de TACI que consiste en un fragmento de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2, en el que el resto del receptor de TACI comprende al menos uno de (i) residuos de aminoácidos 34 a 66 de SEC ID N°: 2, y (ii) residuos de aminoácidos 71 a 104 de SEC ID N°: 2, y en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4, y
- (b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.
- R2. El uso de R1, en el que el resto del receptor de TACI comprende los residuos de aminoácidos 34 a 66 de SEC ID N°: 2 y los residuos de aminoácidos 71 a 104 de SEC ID N°: 2.
- 10 R3. El uso de R1, en el que el resto del receptor de TACI comprende los residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2.
- R4. El uso de R1, en el que el resto del receptor de TACI tiene la secuencia de aminoácidos de residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2
- R5. El uso de R1, en el que el resto de inmunoglobulina comprende una región constante de la cadena pesada.
- 15 R6. El uso de R5, en el que el resto de inmunoglobulina comprende una región constante de la cadena pesada humana.
- R7. El uso de R6, en el que la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1.
- 20 R8. El uso de R7, en el que el resto de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG1 que comprende dominios C_{H2} y C_{H3}.
- R9. El uso de R8, en el que el resto de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 33.
- R10. El uso de R9, en el que proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 54.
- 25 R11. El uso de R1, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina es un dímero.
- R12. El uso de R1, en el que la composición se administra a células cultivadas *in vitro*.
- R13. El uso de R1, en el que la composición es una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y en el que la composición farmacéutica se administra a un sujeto mamífero que tiene un tumor.
- 30 R14. El uso de R13, en el que la administración de la composición farmacéutica inhibe la proliferación de linfocitos B en el sujeto mamífero.
- R15. El uso de una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación de células tumorales en un sujeto mamífero, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 54.
- 35 R16. El uso de R15, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina es un dímero.
- R17. Una proteína de fusión que comprende:
- 40 (a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en un fragmento de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2, en el que el resto del receptor de TACI comprende al menos uno de (i) residuos de aminoácidos 34 a 66 de SEC ID N°: 2, y (ii) residuos de aminoácidos 71 a 104 de SEC ID N°: 2, y en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4, y
- 45 (b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.
- R18. La proteína de fusión de R17, en la que el resto del receptor de TACI comprende los residuos de aminoácidos 34 a 66 de SEC ID N°: 2 y los residuos de aminoácidos 71 a 104 de SEC ID N°: 2.
- R19. La proteína de fusión de R17, en la que el resto del receptor de TACI comprende los residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2.
- 50 R20. La proteína de fusión de R17, en la que el resto del receptor de TACI tiene la secuencia de

aminoácidos de residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2

R21. La proteína de fusión de R17, en la que el resto de inmunoglobulina comprende una región constante de la cadena pesada.

5 R22. La proteína de fusión de R21, en la que el resto de inmunoglobulina comprende una región constante de la cadena pesada humana.

R23. La proteína de fusión de R22, en la que la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1.

R24. La proteína de fusión de R23, en la que el resto de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG1 que comprende los dominios C_{H2} y C_{H3}.

10 R25. La proteína de fusión de R24, en la que el resto de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 33.

R26. La proteína de fusión de R25, en la que proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 54.

R27. La proteína de fusión de R17, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina es un dímero.

15 R28. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de R17.

R29. La molécula de ácido nucleico de R28, en la que la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 53.

20 R30. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 54.

R31. La composición farmacéutica de R30, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina es un dímero.

25 R32. El uso de una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para la preparación de un medicamento para reducir niveles en sangre en circulación de ZTNF4 en un sujeto mamífero, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

30 (a) un resto del receptor de TACI que consiste en un fragmento de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2, en el que el resto del receptor de TACI comprende al menos uno de (i) residuos de aminoácidos 34 a 66 de SEC ID N°: 2, y (ii) residuos de aminoácidos 71 a 104 de SEC ID N°: 2, y en el que el resto del receptor de TACI se une a ZTNF4, y
(b) un resto de inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina.

35 R33. El uso de R32, en el que el resto del receptor de TACI comprende los residuos de aminoácidos 34 a 66 de SEC ID N°: 2 y los residuos de aminoácidos 71 a 104 de SEC ID N°: 2.

R34. El uso de R32, en el que el resto del receptor de TACI comprende los residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2.

R35. El uso de R32, en el que el resto del receptor de TACI tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2

40 R36. El uso de R32, en el que el resto de inmunoglobulina comprende una región constante de la cadena pesada.

R37. El uso de R36, en el que el resto de inmunoglobulina comprende una región constante de la cadena pesada humana.

45 R38. El uso de R37, en el que la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1.

R39. El uso de R38, en el que el resto de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG1 que comprende los dominios C_{H2} y C_{H3}.

R40. El uso de R39, en el que el resto de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 33.

R41. El uso de R40, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 54.

R42. El uso de R32, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina es un dímero.

5 R43. El uso de una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para la preparación de un medicamento, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 54.

R44. El uso de R43, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina es un dímero.

LISTA DE SECUENCIAS

10 <110> ZymoGenetics, Inc.
 <120> Proteínas de fusión de TACI-inmunoglobulina
 <130> 01-20PC
 <150> 60/293.343
 <151> 24/05/2001

15 <160> 70
 <170> FastSEQ para Windows version 3.0

<210> 1
 <211> 1377
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (14)...(892)
 <400> 1

```

agcatcctga gta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg      49
          Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg
                1                5                10

agc cgt gtg gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg acg ggg      97
Ser Arg Val Asp Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly
          15                20                25

gtg gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg      145
Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu
          30                35                40

ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc aac cat cag agc cag cgc      193
Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg
          45                50                55                60
    
```

25

ES 2 379 977 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

aaaggaggag ggagagagat ggagaggagg ggagagagaa agagaggtgg ggagagggga 972
 gagagatatg aggagagaga gacagaggag gcagaaaggg agagaaacag aggagacaga 1032
 gagggagaga gagacagagg gagagagaga cagaggggaa gagaggcaga gagggaaaga 1092
 ggcagagaag gaaagagaca ggcagagaag gagagaggca gagagggaga gaggcagaga 1152
 gggagagagg cagagagaca gagagggaga gagggacaga gagagataga gcaggaggtc 1212
 ggggcactct gactcccagt tcccagtgca gctgtaggtc gtcctcacct aaccacacgt 1272
 gcaataaagt cctcgtgcct gctgctcaca gcccccgaga gccctcctc ctggagaata 1332
 aaaccttttg cagctgcct tctcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1377

- <210> 2
- <211> 293
- <212> PRT
- 5 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

<210> 3
 <211> 285
 <212> PRT
 5 <213> Homo Sapiens

<400> 3

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

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

<210> 4
 <211> 250
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp
 20 25 30

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

<210> 5
 <211> 762
 <212> ADN
 5 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (7)...(759)
 <400> 5

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

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc	96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys	
15 20 25 30	
cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc	144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu	
35 40 45	
ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag	192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu	
50 55 60	
gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag	240
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys	
65 70 75	
ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag	288
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys	
80 85 90	
ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc	336
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	
95 100 105 110	
acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag	384
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	
115 120 125	
gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa	432
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	
130 135 140	
gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	480
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser	
145 150 155	
cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa	528
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	
160 165 170	
ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag	576

ES 2 379 977 T3

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

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

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

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

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

<210> 6
 <211> 251
 <212> PRT
 5 <213> Homo Sapiens
 <400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 7
- <211> 44
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador de PCR.
- <400> 7
- atcagcggaa tcagatctt cagacaaaac tcacacatgc ccac 44
- 10 <210> 8
- <211> 35
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Cebador de PCR.
- <400> 8
- ggcagtctct agatcattta cccggagaca gggag 35
- <210> 9
- <211> 51
- 20 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador de PCR.
- <400> 9
- 25 ccgtgccag cacctgaagc cgagggggca ccgtcagtct tcctctccc c 51
- <210> 10
- <211> 31
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Cebador de PCR.

<400> 10
 ggattctaga ttatttaccg ggagacaggg a 31

<210> 11
 <211> 55
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR.

<400> 11
 10 ggtggcggct cccagatggg tctgtccga gcccagatct tcagacaaaa ctcac 55

<210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de PCR.

<400> 12
 tgggagggct ttgttga 18

20 <210> 13
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR.

25 <400> 13
 tccaacaaag ccctccatc ctccatcgag aaaaccatct cc 42

<210> 14
 <211> 57
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR.

<400> 14
 ggatgatcc atgaagcacc tgtggttct cctcctgctg gtggcggctc ccagatg 57

35 <210> 15
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 40 <223> Cebador de PCR.

<400> 15
 ctcagccagg aaatccatgc cgagttgaga cgcttccgta gaatgagtg cctgggccg 59

<210> 16
 <211> 48
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR.

<400> 16
 50 gcatgtgta gtttgtctg aagatctggg ctcctcagc cccgggag 48

ES 2 379 977 T3

<210> 17
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador de PCR.

<400> 17
gcacagaggc tcagaagcaa gtccagctct cccggggctg aaggagcca gatctcaga 60

10 <210> 18
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR.

15 <400> 18
gggggggta caacccaga gctgtttaa tctagattat ttaccggag acaggg 56

<210> 19
<211> 36
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR.

<400> 19
gagcccaaat ctcagacaa aactcacaca tgcca 36

25 <210> 20
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Cebador de PCR.

<400> 20
taattggcgc gcctctagat tattaccg gagaca 36

<210> 21
<211> 37
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR.

<400> 21
40 ggcgcgcctc tagattaacc cggagacagg gagaggc 37

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

45 <220>
<223> Cebador de PCR.

<400> 22
gagcccaaat ctgagacaa aactcaca 28

<210> 23
50 <211> 33
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR.

<400> 23

5 gtacgtgctt tggtagctct cctcccggg ctt 33

<210> 24

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador de PCR.

<400> 24

cagtaccaaa gcacgtaccg tgtgtca 28

<210> 25

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conductor de tPA optimizado.

20 <400> 25

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg

20 25 30

Phe Arg Arg

35

<210> 26

<211> 995

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

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

<400> 26

ES 2 379 977 T3

aagactcaaa cttagaaact tgaattagat gtggtattca aatccttacg tgccgcgaag 60
 acacagacag cccccgtaag aaccacgaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct 120
 agctgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttccaggc 180
 tgttctttct gtagctcct tgttttcttt ttgtgatc atg ttg cag atg gct ggg 236
 Met Leu Gln Met Ala Gly
 1 5

cag tgc tcc caa aat gaa tat ttt gac agt ttg ttg cat gct tgc ata 284
 Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile
 10 15 20

cct tgt caa ctt cga tgt tct tct aat act cct cct cta aca tgt cag 332
 Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln
 25 30 35

<213> Homo sapiens

<400> 27

```

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

<210> 28

5 <211> 762

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Resto de inmunoglobulina modificado.

10 <221> CDS

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

<400> 28

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

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 251

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 29

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

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

<210> 30
 <211> 762
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

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

10 <400> 30

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

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

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

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

- <210> 31
- <211> 251
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <400> 31

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 225 230 235 240
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245 250

- <210> 32
- <211> 762
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Resto de inmunoglobulina modificado.
- <221> CDS
- <222> (7)...(759)
- 10 <400> 32

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

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

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

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

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

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

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

Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
95					100					105					110	
acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	384
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
			115						120					125		
gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	tcc	tcc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	432
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
			130					135						140		
gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	480
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
		145						150						155		
cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	528
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
	160						165					170				
ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	576
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
175					180					185					190	
ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	624
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
				195					200					205		
tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	672
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
			210						215					220		
cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	720
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
		225						230					235			
cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	tga			762
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
	240						245					250				

<210> 33
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<400> 33

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

<210> 34
 <211> 759
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Resto de inmunoglobulina modificado.
 <221> CDS
 <222> (7)...(756)

10 <400> 34

ES 2 379 977 T3

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

Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser		
		145					150					155					
cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	528	
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys		
	160					165				170							
ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	576	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln		
	175				180				185						190		
ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	624	
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly		
				195				200						205			
tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	672	
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln		
			210					215					220				
cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	720	
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn		
		225					230					235					
cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	tga				759	
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly						
	240					245					250						

<210> 35
 <211> 250
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<400> 35

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

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

- <210> 36
- <211> 762
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Resto de inmunoglobulina modificado.
- <221> CDS
- <222> (7)...(759)

10 <400> 36

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

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

ES 2 379 977 T3

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

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

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

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

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

<210> 37

<211> 251

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 37

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

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

<210> 38
 <211> 762
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

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

10 <400> 38

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

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

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

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

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag 240

Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
		65					70					75				
ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	288
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
	80					85				90						
ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	336
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
	95				100				105						110	
acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	384
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
			115					120					125			
gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	432
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
			130				135						140			
gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	480
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
		145				150						155				
cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	528
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
	160				165				170							
ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	576
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
	175				180				185						190	
ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	624
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
				195				200					205			
tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	672
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
			210					215					220			
cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	720
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
		225				230						235				

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

<210> 39
 <211> 251
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <400> 39

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

<210> 40
 <211> 29
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR.

<400> 40

tattaggccg gccacatgg atgcaatga 29

5 <210> 41

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador de PCR.

<400> 41

tgaagatttg ggctccttga gacctggga 29

<210> 42

<211> 29

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR.

<400> 42

20 tcccaggctc caaggagccc aaatctca 29

<210> 43

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Cebador de PCR.

<400> 43

tgaagatttg ggctcgttct cacagaagta 30

<210> 44

30 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR.

35 <400> 44

atattctgt gagaacgagc ccaaatcttc a 31

<210> 45

<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Cebador de PCR.
<400> 45
tttgggctcg ctctgagct tgttccaca 30
<210> 46
<211> 28
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de PCR.
<400> 46
15 ctccaggagcg agcccaaattc ttccagaca 28
<210> 47
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Cebador de PCR.
<400> 47
tttgggctcc ctgagctctg gtggaa 26
<210> 48
25 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de PCR.
30 <400> 48
gagctcaggg agcccaaattc ttccagaca 28
<210> 49
<211> 1214
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Proteína de fusión.

ES 2 379 977 T3

<221> CDS

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

<400> 49

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

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

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

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

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

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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

5 <400> 50

```

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

```


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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

<210> 53

<211> 1082

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

<221> CDS

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

10 <400> 53

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

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

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

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

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

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

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

ttc tgt gag aac aag ctc agg agc gag ccc aaa tct tca gac aaa act	388
Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr	
110 115 120	
cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca	436
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser	
125 130 135 140	
gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg	484
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
145 150 155	
acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct	532
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	
160 165 170	
gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc	580
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
175 180 185	
aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc	628
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
190 195 200	
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac	676
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
205 210 215 220	
aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc	724
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr	
225 230 235	
atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg	772
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
240 245 250	
ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc	820
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
255 260 265	
ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc	868
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
270 275 280	

```

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

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

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

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

taatctagag.gcgcgccaat ta 1082

```

<210> 54

<211> 348

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

<400> 54

```

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

```

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

<210> 55

<211> 1109

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

<221> CDS

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

10 <400> 55

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
			160					165					170			
gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	580
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
		175					180					185				
gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	628
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
	190					195					200					
cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	676
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
205					210					215					220	
cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	724
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				225					230					235		
gcc	ctc	cca	tcc	tcc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	772
Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
			240					245					250			
ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	820
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	
		255					260					265				
acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	868
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
	270					275					280					
agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	916
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
285					290					295					300	
tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	964
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
				305					310					315		
tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	1012
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
			320					325					330			

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag 1060
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 335 340 345

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa tctagaggcg cgccaatta 1109
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *
 350 355

<210> 56

<211> 357

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

<400> 56

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

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 195 200 205
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 210 215 220
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser
 225 230 235 240
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 245 250 255
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 260 265 270
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 275 280 285
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 290 295 300
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350
 Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 57

<211> 9

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos ilustrativa.

<400> 57

atgcacggg 9

10 <210> 58

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de nucleótidos ilustrativa.

<400> 58

cccgtgca 9

<210> 59

ES 2 379 977 T3

<211> 586

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> CDS

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

<400> 59

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys
 110 115 120

gac gcc cca gag ccc ctg gac aag gtc atc att ctg tct ccg gga atc 437
 Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile
 125 130 135

tct gat gcc aca gct cct gcc tgg cct cct cct ggg gaa gac cca gga 485
 Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly
 140 145 150

acc acc cca cct ggc cac agt gtc cct gtg cca gcc aca gag ctg ggc 533
 Thr Thr Pro Pro Gly His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly
 155 160 165

tcc act gaa ctg gtg acc acc aag acg gcc ggc cct gag caa caa 578
 Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 170 175 180

tagcaggg 586

<210> 60

<211> 184

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 60

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

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

<210> 61

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia señal de 26-10 VH.

<400> 61

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

10 <210> 62

<211> 332

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Proteína de fusión.

<400> 62

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

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

<210> 63

<211> 51

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 26-10 VH 5' UTR.

<400> 63

aacatagtgc caatgtcctc tocacagaca ctgaacacac tgactccaac g

51

<210> 64
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> 26-10 VH 5' UTR modificada.
 <400> 64
 aacatatgct caatgtcctc tccacagaca ctgaacacac tgactgccac c 51

<210> 65
 10 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia señal de 26-10 VH.

15 <221> CDS
 <222> (1)...(57)
 <400> 65

atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttt ctt ctg tca gga act gca ggt 48
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15

gtc ctc tct 57
 Val Leu Ser

<210> 66
 20 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Intrón de 26-10 VH.

25 <400> 66

gtaaggggct ccccagttcc aaaatctgaa gaaaagaaat ggcttgggat gtcacagata 60
 tccactctgt ctttctcttc acag 84

<210> 67
 <211> 1135
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

<400> 67

```

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

5 <210> 68

<211> 1135

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión.

<400> 68

```

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

atctgaagaa aagaaatggc ttgggatgtc acagatatcc actctgtctt tctcttcaca	180
ggtgtcctct ctgctatgag atcctgcccc gaagagcagt actgggatcc tctgctgggt	240
acctgcatgt cctgcaaaac catttgcaac catcagagcc agcgcacctg tgcagccttc	300
tgcaggtcac tcagctgccg caaggagcaa ggcaagttct atgaccatct cctgagggac	360
tgcatacagct gtgcctccat ctgtggacag caccctaage aatgtgcata cttctgtgag	420
aacaagctca ggagcgagcc caaatcttca gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc	480
gcacctgaag ccgagggggc accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac	600
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	660
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	720
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctccccatcc	780
tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	840
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtea gcctgacctg cctggtcaaa	900
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	960
tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc	1020
accgtggaca agagcagggt gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	1080
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa ataaa	1135

<210> 69

<211> 884

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 69

cgcgttacat aacttacggt aaatggcccc cctggctgac cgcccaacga cccccccca	60
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt	120
caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg	180
ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag	240
tacatgacct tatgggactt tctacttg cagtacatct acgtattagt catcgctatt	300
accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg	360
ggatttccaa gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttgaat gaaagacccc	420
acctgtaggt ttggcaagct agcttaagta acgccatttg caaggcatgg aaaaatacat	480
aactgagaat agagaagttc agatcaaggt caggaacaga gaaacaggag aatatgggcc	540
aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccgctcag ggccaagaac agttggaaca	600
ggagaatatg ggccaaacag gatatctgtg gtaagcagtt cctgccccgc tcagggccaa	660
gaacagatgg tccccagatc ggtccccccc tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt	720
tccaggggtc cccaaggacc tgaatgacc ctgtgectta ttgaaactaa ccaatcagtt	780
cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tccccgagct caataaaaga gcccaaac	840
cctcactcgg cgcgccagtc ctccgataga ctgcgtcgcc cggg	884

10 <210> 70

ES 2 379 977 T3

<211> 455

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Promotor del MPSV LTR sin la región de control negativo.

<400> 70

```
aatgaaagac cccacctgta ggtttgcaa gctagaaggt taggaacaga gagacagcag      60
aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccggtca gggccaagaa      120
cagatgggcc ccagatgcgg tcccgcctc agcagttct agagaaccat cagatgttc      180
cagggtgccc caaggacctg aaaatgacce tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc      240
gcttctcgct tctgttcgcg cgcttctgct ccccgagctc aataaaagag cccacaaccc      300
ctcactcggc gcgccagtcc tccgatagac tgcgtcgccc gggtaacctg gttctcaata      360
aacctcttg cagttgcac cgactcgtgg tctcgtgtt ccttgggagg gtctcctctg      420
agtgattgac tacccgtcag cgggggtctt tcagt                                     455
```

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para su uso en la inhibición de la proliferación de células tumorales, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

5 (a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
- (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
- 10 (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y
(b) un resto de inmunoglobulina.

2. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 1, en la que la administración es a un sujeto mamífero que tiene un tumor.

15 3. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 2, en la que dicha inhibición comprende inhibir la proliferación de linfocitos B en el sujeto mamífero.

4. Una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

20 (a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
- (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
- 25 (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y
(b) un resto de inmunoglobulina.

30 5. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 4, en la que dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en miastenia grave, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide juvenil de evolución poliarticular y artritis psoriásica.

6. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 4, en la que dicha enfermedad autoinmunitaria es lupus eritematoso sistémico.

7. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 4, en la que dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.

35 8. Una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para su uso en el tratamiento de asma, bronquitis o enfisema, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

40 (a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
- (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
- (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y
(b) un resto de inmunoglobulina.

45 9. Una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para su uso en el tratamiento de enfermedad renal, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

50 (a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
- (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
- (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

5 en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y
(b) un resto de inmunoglobulina.

10. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 9, en la que dicha enfermedad renal se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia renal terminal, glomerulonefritis, vasculitis, nefritis, amiloidosis y pielonefritis.

10 11. Una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a inmunosupresión, rechazo de injerto, enfermedad de injerto frente a huésped, inflamación, dolor de articulaciones, hinchazón, anemia y choque séptico, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

15 (a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEQ ID NO-2;
- (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
- (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

20 en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y
(b) un resto de inmunoglobulina.

25 12. Una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado de neoplasia, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad linfoproliferativa postrasplante y gammapatía de cadenas ligeras, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

(a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 30
- (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
 - (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
 - (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y
(b) un resto de inmunoglobulina.

35 13. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que dicha proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina consiste en o comprende una proteína de fusión de TACI-Fc; preferentemente en la que dicha proteína de fusión de TACI-Fc es una proteína de fusión de Fc de inmunoglobulina humana.

40 14. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que dicho resto de inmunoglobulina consiste en la región bisagra de la cadena pesada de la inmunoglobulina ligada por disulfuro y los dominios C_{H2} y C_{H3}.

15. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que el resto de inmunoglobulina es un resto Fc de inmunoglobulina IgG1.

45 16. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que dicho resto de inmunoglobulina consiste en o comprende un resto Fc de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en Fc4, Fc5, Fc6, Fc7 o Fc8; preferentemente en la que dicho resto de inmunoglobulina consiste en o comprende un resto Fc5 de inmunoglobulina.

17. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina consiste en o comprende una forma secretada de una cualquiera de SEC ID N°: 50, 52, 54 ó 56.

50 18. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 50, 52, 54 ó 56, en la que se ha eliminado la secuencia

conductora de tPA (tPAo) optimizada (SEC ID N°: 25).

19. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina es un dímero.

5 20. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la proliferación de células tumorales que comprende administrar a dichas células tumorales una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

(a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 10 (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
 (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
 (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y
 (b) un resto de inmunoglobulina.

15 21. Una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI)-inmunoglobulina, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina comprende:

(a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 20 (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
 (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
 (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y
 (b) un resto de inmunoglobulina;

25 y en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina consiste en o comprende una forma secretada de una cualquiera de SEC ID N°: 50, 52, 54 ó 56.

30 22. La proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina según la reivindicación 21, en la que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 50, 52, 54 ó 56, en la que se ha eliminado la secuencia conductora de tPA optimizada (tPAo) (SEC ID N°: 25).

23. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión según la reivindicación 21 o la reivindicación 22.

35 24. Un procedimiento para preparar una proteína de fusión de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina TACI-inmunoglobulina, comprendiendo dicho procedimiento expresar una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión, en el que dichas secuencias de ácidos nucleicos están operativamente ligadas a una secuencia reguladora que controla la expresión transcripcional en un vector de expresión; en el que dicha proteína de fusión comprende:

40 (a) un resto del receptor de interactor de activador transmembrana y de moduladores de calcio y ligandos de ciclofilina (TACI), en el que el resto del receptor de TACI consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) residuos de aminoácidos 34 a 104 de SEC ID N°: 2;
 (ii) residuos de aminoácidos 30 a 110 de SEC ID N°: 2; y
 (iii) residuos de aminoácidos 30 a 154 de SEC ID N°: 2;

45 en el que el resto del receptor de TACI se une a al menos uno de ZTNF2 o ZTNF4; y
 (b) un resto de inmunoglobulina.

25. El procedimiento según la reivindicación 24, en el que dicha proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina consiste en o comprende una proteína de fusión de TACI-Fc.

26. El procedimiento según la reivindicación 25, en el que dicha proteína de fusión TACI-Fc es una proteína de fusión de Fc de inmunoglobulina humana.

50 27. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24-26, en el que dicho resto de inmunoglobulina

consiste en la región bisagra de la cadena pesada de la inmunoglobulina ligada por disulfuro y los dominios C_{H2} y C_{H3}.

28. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24-27, en el que el resto de inmunoglobulina es un resto Fc de inmunoglobulina IgG1.
- 5 29. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24-28, en el que dicho resto de inmunoglobulina consiste en o comprende un resto Fc de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en Fc4, Fc5, Fc6, Fc7 o Fc8; preferentemente en el que dicho resto de inmunoglobulina consiste o comprende un resto Fc5 de inmunoglobulina.
- 10 30. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24-29, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina consiste en o comprende una forma secretada de una cualquiera de SEC ID N°: 50, 52, 54 ó 56.
31. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24-30, en el que la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 50, 52, 54 ó 56, y en la que se ha eliminado la secuencia conductora de tPA (tPAo) optimizada (SEC ID N°: 25).
- 15 32. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24-31, en el que dicho procedimiento comprende expresar la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión en una célula huésped; preferentemente en el que dicha célula huésped es una célula de ovario de hámster chino.
33. El procedimiento según la reivindicación 32, en el que la célula de ovario de hámster chino carece de un gen de dihidrofolato-reductasa funcional.
- 20 34. El procedimiento según la reivindicación 32 o la reivindicación 33, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina se transfecta en la célula huésped en forma de un vector de expresión.
35. El procedimiento según la reivindicación 34, en el que el vector de expresión comprende un plásmido de expresión; preferentemente en el que el plásmido de expresión comprende un promotor del CMV y un segmento poli A de SV40.
- 25 36. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en el que el crecimiento de las células huésped en presencia de concentraciones elevadas de metotrexato produce la amplificación del gen de dihidrofolato-reductasa y la secuencia de nucleótidos ligada que codifica la proteína de fusión de TACI-inmunoglobulina.

10 20 30 40 50
MSGLGRSRRG GRSRVDQEER FPQGLWTGVA MRSCPEEQYW DPLLGTCMSC

60 70 80 90 100
KPTICNHQSOR TCAAFORSLS CRKEQGKEYD HLLRDCISCA SIGGQHPKQD

110 120 130 140 150
AYECENKLSR PVNLPPELRR QRSGEVENNS DNSGRYQGLE HRGSEASPAL

160 170 180 190 200
PGLKLSADQV ALVYSTLGLC LCAVLCCFLV AVACFLKKRG DPCSCQPRSR

210 220 230 240 250
PRQSPAKSSQ DHAMEAGSPV STSPEPVETC SFCFPECRAP TOESAVTPGT

260 270 280 290
PDPTCAGRWG CHTRTTVLQP CPHIPDSGLG IVCVPAQEGG PGA

Figura 1

	LC										HC			HC	
	218				222						230				
	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
wt	.	.	Arg	.	Ser
Fc-488	.	.	Arg	.	Ser
Fc4	.	.	Arg	.	Ser
Fc5	Ser
Fc6	Ser
Fc7	Ser
Fc8	Ser

<- bisagra ->

	234 235				237			245							
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
wt
Fc-488	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala
Fc4	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala
Fc5	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala
Fc6	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala
Fc7
Fc8

CH2 ->

	260														
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
wt
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
Fc8

	275														
	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
wt
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
Fc8

Figura 3A

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

																		297		305
wt	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val					
Fc-488			
Fc4			
Fc5			
Fc6			
Fc7	Gln			
Fc8			

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

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

Figura 3B

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

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

														431				440
wt	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser			
Fc-488			
Fc4			
Fc5			
Fc6			
Fc7			
Fc8			

								446
wt	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6	***	.
Fc7
Fc8

Figura 3D

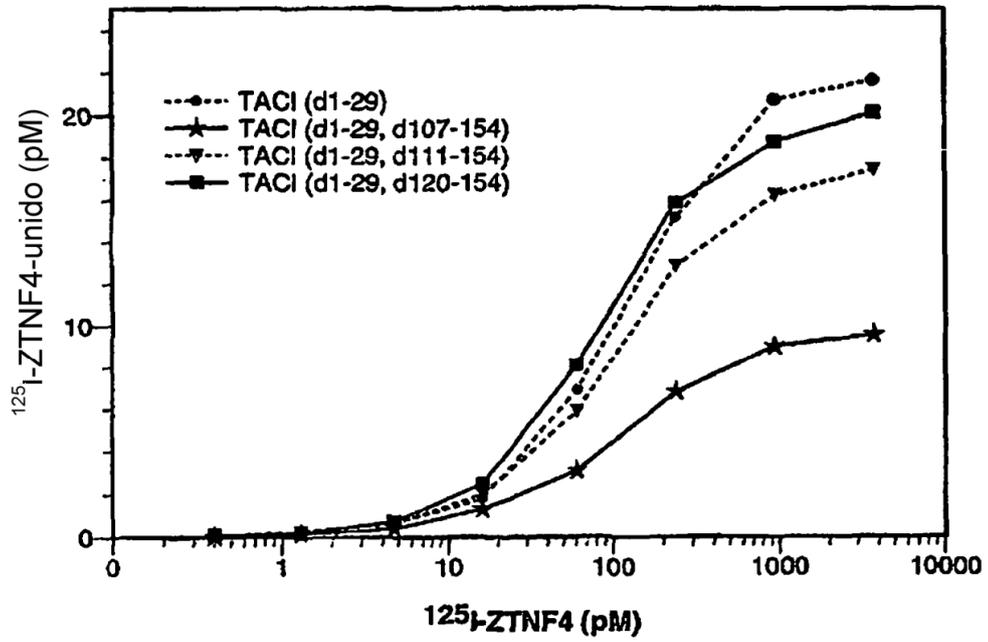


Figura 4