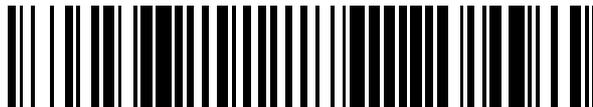


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 107**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

C07K 14/565 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2008 E 08840928 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2203180**

54 Título: **IFN-beta sencillo fusionado a un fragmento Fc de IgG mutado**

30 Prioridad:

22.10.2007 EP 07118980

11.12.2007 US 7142 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.04.2013

73 Titular/es:

MERCK SERONO S.A. (100.0%)

CENTRE INDUSTRIEL

1267 COINSINS, CH

72 Inventor/es:

HJELMSTROM, PETER;

IMHOF, MARKUS;

FEGER, GEORGE;

JENKINS, NIGEL;

DUPRAZ, PHILIPPE;

POWER, CHRISTINE;

MAGNENAT, LAURENT;

CHATELLARD, PHILIPPE;

PANKIEWICZ, RENATA;

DECHAVANNE, VINCENT y

BOZZATO, GIAN BATTISTA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 400 107 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

IFN-beta sencillo fusionado a un fragmento Fc de IgG mutado

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un IFN-beta sencillo fusionado a un fragmento Fc de IgG mutado (denominado en lo sucesivo sIFNbeta-IgGFcmut), los nucleótidos que codifican el mismo, los vectores y vectores de expresión que comprenden el mismo, las células anfitrionas transformadas con el mismo y su uso como medicamento así como su uso en particular para tratar la esclerosis múltiple. El IFN-beta sencillo fusionado a un fragmento Fc de IgG mutado comprende dos subunidades, comprendiendo la primera subunidad un brazo Fc de IgG mutado no ligado a una proteína IFN-beta y comprendiendo la segunda subunidad un brazo Fc de IgG mutado ligado a una proteína IFN-beta sencilla.

Antecedentes de la Invención

15 Se ha informado (véase Spiekermann GM et al. 2002) que las proteínas que comprenden el fragmento Fc de una inmunoglobulina (Ig) ligado a una proteína de interés, por ejemplo, Eritropoyetina (EPO), permiten la administración inhalable, aparentemente a través de la unión al receptor de Fc relacionado con la clase I del MHC, FcRn, presente en los pulmones humanos adultos que reconoce, se une y acepta el fragmento Fc de las inmunoglobulinas. La fusión de una proteína a un fragmento Fc de inmunoglobulina permite que la proteína híbrida sea reconocida por el FcRn. El fragmento Fc de inmunoglobulina consiste en dos brazos idénticos que comprenden la región bisagra (H) y el segundo (CH₂) y tercer (CH₃) dominio de una cadena pesada de anticuerpo.

20 El FcRn es activo en tejido epitelial adulto (humano pero no de roedor) y se expresa en el lumen del intestino, las vías aéreas pulmonares, las superficies nasales, las superficies vaginales, las superficies del colon y el recto (Documento US 6.485.726). Las proteínas que comprenden un compañero de unión de FcRn (por ejemplo, IgG, proteínas de fusión que contienen fragmentos Fc) pueden ser transportadas eficazmente a través de barreras epiteliales por los FcRn, proporcionando así un medio no invasivo para administrar sistémicamente una molécula terapéutica deseada.

25 Se sabe que el fragmento Fc, también llamado dominio Fc, de las inmunoglobulinas (p. ej. las IgG) es responsable de las denominadas funciones efectoras asociadas con la administración de una inmunoglobulina (IgG) o de una proteína de fusión que comprende dicho dominio Fc (IgGFc). Tales funciones efectoras incluyen la citotoxicidad celular dependiente anticuerpos (ADCC) a través de interacciones con los receptores de Fc (FcγR) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante la unión al componente 1q del complemento (C1q).

30 Las isoformas de IgG ejercen diferentes niveles de funciones efectoras. La IgG1 y la IgG3 humanas tienen fuertes efectos ADCC y CDC, mientras que la IgG2 humana ejerce efectos ADCC y CDC débiles. La IgG4 humana despliega ADCC débil y ningún efecto CDC.

35 En la ADCC, la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, IgG) se une a los receptores de Fc (FcγR) sobre la superficie de las células efectoras inmunitarias tales como las asesinas naturales y los macrófagos, conduciendo a la fagocitosis o lisis de las células elegidas como diana.

En la CDC, el anticuerpo (por ejemplo, IgG) destruye las células elegidas como diana mediante la activación de la cascada del complemento en la superficie celular. Las isoformas de IgG ejercen diferentes niveles de funciones efectoras aumentando en el orden de IgG4 < IgG2 < IgG1 ≤ IgG3.

40 Los interferones son secretados naturalmente por las células infectadas y se identificaron por primera vez en 1957. Su nombre deriva del hecho de que "interfieren" en la replicación y la producción viral. El interferón beta es un interferón bien conocido que se utiliza actualmente para tratar la esclerosis múltiple.

45 Se ha informado (documento WO 2005/001025) que los híbridos de dímero-monómero, con una molécula biológicamente activa, pero dos porciones de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, dos compañeros de unión de FcRn, funcionan y pueden ser transportados con mayor eficacia que los homodímeros, también denominados aquí simplemente como dímeros o multímeros de orden superior con dos o más copias de la molécula biológicamente activa. Los híbridos de monómero-dímero de interferón beta se describen en el documento WO 2005/001025. Un híbrido de monómero-dímero que comprende interferón beta humano fusionado con la región Fc de IgG1 humana se describe en el documento WO 2006/074199.

Compendio de la Invención

50 En un primer aspecto, la invención proporciona un IFN-beta sencillo fusionado a un dominio Fc de IgG mutado (denominado en lo sucesivo sIFNbeta-IgGFcmut). El sIFNbeta-IgGFcmut de la invención consiste en dos subunidades, la primera subunidad comprende un brazo Fc de IgG mutado no ligado (brazo Fcmut) a una proteína IFN-beta y la segunda subunidad comprende un brazo Fc de IgG mutado ligado a una proteína IFN-beta sencilla (brazo IFNbeta-Fcmut) donde dicha primera subunidad consiste en el SEQ ID NO: 3 y dicha segunda subunidad

consiste en el SEQ ID NO: 8. Las mutaciones introducidas dan como resultado una ADCC menor y una CDC menor. En una realización preferida, las mutaciones son L234A, L235E, G237A, A330S y P331S. En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido, p. ej. un ADN, que codifica un sIFNbeta-IgGFcmut de acuerdo con la presente invención, los vectores y más concretamente los vectores de expresión que contienen dicho ADN.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una célula anfitriona, preferiblemente una célula CHO, que contiene, por ejemplo, como resultado de una transfección, un vector y en particular un vector de expresión de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un sIFNbeta-IgGFcmut de acuerdo con la presente invención y su uso como un medicamento, en particular para tratar la esclerosis múltiple.

10 En otro aspecto, la invención describe el uso de un sIFNbeta-IgGFcmut acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la leucemia de células pilosas, el sarcoma de Kaposi, la leucemia mielógena crónica, la esclerosis múltiple, la hepatitis A, la hepatitis B, la hepatitis C, el VIH y/o las infecciones causadas por virus seleccionados ente el virus de Epstein-Barr, el virus del herpes y/o el virus del papiloma.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para elaborar un sIFNbeta-IgGFcmut acuerdo con la invención, el método que comprende cultivar una célula anfitriona, preferiblemente una célula CHO, de acuerdo con la invención y aislar el sIFNbeta-IgGFcmut de acuerdo con la presente invención.

Descripción Detallada de la Invención

20 La presente invención se refiere a un IFN-beta sencillo fusionado a un dominio Fc de IgG mutado (denominado en lo sucesivo sIFNbeta-IgGFcmut) que se puede liberar a través de absorción pulmonar, oral o subcutánea. El sIFNbeta-IgGFcmut de la presente invención presenta funciones efectoras de Fc reducidas, buena actividad biológica, a la vez que todavía mantiene niveles en suero y vida media elevados en el sistema circulatorio.

25 En un primer aspecto, la invención describe un sIFNbeta-IgGFcmut que contiene dos subunidades, comprendiendo la primera subunidad un brazo Fc de IgG mutado no ligado (brazo Fcmut) a una proteína IFN-beta y comprendiendo la segunda subunidad un brazo Fc de IgG mutado ligado a una proteína IFN-beta sencilla (brazo IFNbeta-Fcmut) donde el dominio Fc de IgG mutado (IgGFcmut) es un dominio Fc de inmunoglobulina gamma de (IgG)-1 donde al menos las posiciones 234, 235, 237, 330 y 331, de acuerdo con la posición del índice de EU como definen Kabat et al. (Kabat E. A. et al. 1991), se han mutado. Las mutaciones introducidas dan como resultado una ADCC menor y una CDC menor. En una realización preferida, las mutaciones son L234A, L235E, G237A, A330S y P331S. Con el fin de evitar confusión en la numeración de las posiciones de las mutaciones, en la siguiente Tabla 1 se informa de
30 una comparación entre las posiciones de los aminoácidos de algunos SEQ ID NO: de la invención y el índice de EU:

Tabla 1

Mutaciones	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 3, 5	SEQ ID NO: 8, 10	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	Índice de EU (Kabat)
L→A	117	14	180	14	188	234
L→E	118	15	181	15	189	235
G→A	120	17	183	17	191	237
A→S	213	110	276	110	284	330
P→S	214	111	277	111	285	331
N→A	180	77	243	77	251	297

35 En la población se encuentran diferentes alotipos de IgG1. La región constante pesada de IgG1 humana citada en el SEQ ID NO: 1 es el alotipo referido como "marcador G1M (no 1)" en Uniprot (número de acceso P01857). Las mutaciones descritas en la presente invención se pueden realizar en todos los alotipos diferentes encontrados en la población. En la presente invención, el dominio Fc se derivó del alotipo "marcador G1M (no 1)" (véase el Ejemplo 1), sin embargo, el dominio Fc también se puede derivar de cualquier otro alotipo.

40 Un dominio Fc de inmunoglobulina gamma (IgG)-1 donde al menos las posiciones 234, 235, 237, 330 y 331, de acuerdo con la posición del índice de EU, se han mutado para dar como resultado una ADCC menor y una CDC menor será referido aquí como IgGFcmut. El brazo del IgGFcmut no ligado a una proteína IFN-beta será referido en la presente memoria como brazo Fcmut. El brazo de IgGFcmut ligado a una proteína IFN-beta sencilla será referido

en la presente memoria como brazo IFNbeta-Fcmut (Figura 1). En una realización preferida, las mutaciones en el IgGFcmut son L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.

5 En la presente memoria, un dominio Fc puede ser referido como un fragmento Fc, radical de Fc o región Fc. En la presente memoria, los términos "dominio Fc", "fragmento Fc", "región Fc" o "radical de Fc" son intercambiables y se debe interpretar que tienen el mismo significado.

El sIFNbeta-IgGFcmut de la invención presenta una actividad biológica similar a la proteína monómero-dímero de IFN-beta descrita en el documento WO 2005/001025. La actividad biológica de IFN-beta se mide típicamente en un ensayo antiviral tal como el descrito en el Ejemplo 5.

10 El sIFNbeta-IgGFcmut de la invención reduce o inhibe la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por ejemplo, el sIFNbeta-IgGFcmut de la invención reduce o inhibe la unión a los receptores de Fc FcγRI, CD64, IIA, IIB, IIIA y/o IIIB, y/o reduce o inhibe la unión a C1q. Además, el sIFNbeta-IgGFcmut de la invención mantiene las propiedades de unión (o de afinidad) para el FcRn. La reducción o inhibición de la ADCC y la CDC, si bien mantiene la unión a FcRn del sIFNbeta-IgGFcmut de la invención son conferidas por las cinco mutaciones presentes en el dominio Fc. La invención proporciona sIFNbeta-IgGFcmut que exhibe la misma actividad biológica y las mismas propiedades de unión para el FcRn, con reducción o inhibición de la ADCC y la CDC.

El sIFNbeta-IgGFcmut de la invención puede ser administrado mediante inhalación o mediante administración subcutánea.

20 Los niveles en suero y la vida media elevados en el sistema circulatorio (tiempo de residencia prolongado en los fluidos corporales) del sIFNbeta-IgGFcmut de la presente invención convierten la vía subcutánea en una forma preferida de administración.

El sIFNbeta-IgGFcmut de la invención puede ser purificado mediante el uso de cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G.

25 El sIFNbeta-IgGFcmut acuerdo con la invención contiene 5 mutaciones en el dominio Fc. En esta realización, la ADCC y la CDC se inhiben significativamente o al menos se reducen significativamente.

30 La invención describe ente otros un sIFNbeta-IgGFcmut que contiene dos subunidades, comprendiendo la primera subunidad un brazo Fc mutado de un dominio Fc de IgG no ligado (brazo Fcmut) a una proteína IFN-beta y comprendiendo la segunda subunidad un brazo Fc mutado del mismo dominio Fc de IgG ligado a una proteína IFN-beta sencilla (brazo IFNbeta-Fcmut) en la que el dominio Fc de IgG mutado (IgGFcmut) es un dominio Fc de una inmunoglobulina gamma (IgG)-1 donde al menos las posiciones 234, 235, 237, 330 y 331, de acuerdo con la posición del índice de EU, se han mutado. Las mutaciones introducidas dan como resultado una ADCC menor y una CDC menor. En una realización preferida, las mutaciones son L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.

35 En una realización preferida, el dominio Fc no contiene la mutación N → A en el residuo de aminoácidos correspondiente a la posición del índice de EU número 297. En una realización, la invención describe un sIFNbeta-IgGFcmut que contiene dos subunidades, comprendiendo la primera subunidad un brazo Fc de IgG mutado no ligado (brazo Fcmut) a una proteína IFN-beta y comprendiendo la segunda subunidad un brazo Fc de IgG mutado ligado a una proteína IFN-beta sencilla (brazo IFNbeta-Fcmut) donde el dominio Fc es el IgGFcmut y donde el brazo IFNbeta-Fcmut comprende un brazo Fc de IgG mutado que está directamente ligado a IFN-beta. En esta realización, el sIFNbeta-IgGFcmut no contiene ningún ligador entre IgGFcmut e IFN-beta.

40 En otra realización, la invención describe un sIFNbeta-IgGFcmut que contiene dos subunidades, comprendiendo la primera subunidad un brazo Fc de IgG mutado no ligado (brazo Fcmut) a una proteína IFN-beta y comprendiendo la segunda subunidad un brazo Fc de IgG mutado ligado a una proteína IFN-beta sencilla (brazo IFNbeta-Fcmut) en el que el dominio Fc es el IgGFcmut y donde el brazo IFNbeta-Fcmut comprende un brazo Fc de IgG mutado que no está directamente ligado a IFN-beta.

45 En una realización preferida adicional, el IgGFcmut no incluye la mutación N → A en el residuo de aminoácido correspondiente a la posición número 297 del índice de EU. Por lo tanto, el IgGFcmut de acuerdo con la invención presenta en la posición 297 el aminoácido N. Uno de los sIFNbeta-IgGFcmut descritos en la presente memoria puede contener un ligador entre el IgGFcmut e IFN-beta.

50 El dominio Fc de IgG1 contiene al menos cinco mutaciones seleccionadas entre L234A, L235E, G237A, A330S y P331S, de acuerdo con la posición del índice de EU o al menos estas cinco mutaciones en las posiciones equivalentes de cualquier otro dominio Fc. De este modo, las mutaciones anteriores se pueden realizar en el dominio Fc de cualquier alotipo IgG1.

55 Las tres mutaciones en 234 (por ejemplo L234A), 235 (por ejemplo, L235E) y 237, (por ejemplo G237A) están diseñadas para reducir o inhibir la ADCC; las dos mutaciones en 330 (p. ej. A330S) y 331 (p. ej. P331S) para reducir o inhibir la CDC.

En una realización, el dominio Fc comprende o consiste en el dominio CH₂ y/o el dominio CH₃ y, opcionalmente, el dominio CH₁, la región bisagra o un fragmento de la misma, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el dominio Fc comprende o consiste en la región de bisagra o un fragmento de la misma, el dominio CH₂ y el dominio CH₃. En una realización, el dominio Fc comprende o consiste en el dominio CH₂ y el dominio CH₃.

- 5 La denominada "región bisagra" tal como se define en la presente invención es una región específica situada entre los CH₁ y CH₂. La región bisagra es particularmente sensible a la escisión proteolítica; tal proteólisis proporciona dos o tres fragmentos dependiendo del sitio preciso de escisión.

En una realización, el fragmento de la región bisagra consiste de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 aminoácidos.

- 10 En otra realización, el fragmento de la región bisagra consiste en 7 aminoácidos. Preferiblemente, la región bisagra comprende o consiste en el SEQ ID NO: 2 (DKTHTCP).

- Más preferiblemente, el IgGFcmut está compuesto por el brazo Fcmut que comprende o consiste en el SEQ ID NO: 3 y por la porción de aminoácidos de los residuos 167 a 393 del brazo IFNbeta-Fcmut que comprende o consiste en el SEQ ID NO: 8 (Figura 1). El SEC ID NO: 3 contiene las mutaciones L14A, L15E, G17A, A110S y P111S que corresponden, respectivamente, a las mutaciones de IgG1 L234A, L235E, G237A, A330S y P331S, de acuerdo con la posición del índice de EU. El SEQ ID NO: 8 contiene las mutaciones L180A, L181E, G183A, A276S y P277S que corresponden, respectivamente, a las mutaciones de IgG1 L234A, L235E, G237A, A330S y P331S, de acuerdo con la posición del índice de EU. Uno de los dominios Fc descritos en la presente memoria también puede modificarse adicionalmente con el fin de reducir o inhibir las funciones efectoras.

- 20 Las siguientes mutaciones de Fc, de acuerdo con las posiciones del índice de EU, se puede introducir adicionalmente en el dominio Fc de IgG1:

T250Q y/o M428L,

M252Y, S254T, T256E, H433K y/o N434F,

E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y/o P331S,

E333A y/o K322A.

- 25 Las mutaciones T250Q y/o M428L pueden aumentar la vida media en suero de las proteínas.

Las mutaciones M252Y, S254T, T256E, H433K y/o N434F pueden aumentar la vida media en suero de las proteínas.

Las mutaciones E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y/o P331S pueden reducir o inhibir la ADCC y la CDC.

- 30 Mutaciones en Fc adicionales pueden ser, p. ej, las sustituciones en las posiciones del índice de EU seleccionadas entre 330, 331, 234, o 235, o combinaciones de las mismas. Además, el residuo de cisteína en la posición del índice de EU 220 también se puede reemplazar por un residuo de serina, eliminando el residuo de cisteína que normalmente forma enlaces disulfuro con la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina.

- 35 En una realización, un sIFNbeta-IgGFcmut descrito en la presente memoria comprende adicionalmente un ligador entre el dominio Fc y la citoquina. En una realización, el ligador es un péptido que puede ser tan corto como de 1 a 3 residuos de aminoácidos de longitud o más, por ejemplo, 13 residuos de aminoácidos de longitud.

- 40 El ligador puede ser un tripéptido de la secuencia de EFM (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia conectora de 13 aminoácidos que comprende EFGAGLVGGQFM (Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met) introducida entre la secuencia de la citoquina y la secuencia de la inmunoglobulina. Preferiblemente, el ligador comprende o consiste en el SEQ ID NO: 13 (EFAGAAAV).

Preferiblemente, el IFN es el IFN-beta humano (IFN-β), más preferiblemente un IFN-beta humano recombinante. El interferón beta-1a es una glicoproteína de 166 aminoácidos purificada con un peso molecular de aproximadamente 22.500 Daltons. Se produce mediante tecnología de ADN recombinante utilizando células de ovario de hámster chino diseñadas mediante ingeniería genética en las que ha sido introducido el gen del interferón beta humano.

- 45 Preferiblemente, el IFN es un IFN-beta humano recombinante que tiene una glicosilación derivada de células CHO. Preferiblemente, tanto el radical de IFN-β como las cadenas Fc están glicosiladas. Más preferiblemente, el IFN-beta consiste en el SEQ ID NO: 7.

Rebif[®] y Avonex[®] son dos ejemplos de preparaciones comerciales de interferón beta-1a derivado de CHO.

Betaseron[®] es un ejemplo de preparación comercial de interferón beta-1b derivado de E. coli.

La primera subunidad de sIFNbeta-IgGFcmut de acuerdo con la presente invención que comprende un brazo Fc de IgG mutado no ligado (brazo Fcmut) a una proteína IFN-beta comprende o consiste en el SEQ ID NO: 3. El SEC ID NO: 3 con su péptido señal (péptido señal de la cadena ligera de IgK de ratón, véase el Ejemplo 1) se especifica en el SEQ ID NO: 5.

- 5 La segunda subunidad de sIFNbeta-IgGFcmut de acuerdo con la presente invención que comprende un brazo Fc de IgG mutado ligado a una proteína IFN-beta sencilla (brazo IFNbeta-Fcmut) comprende o consiste en el SEQ ID NO: 8. El SEC ID NO: 8 con su péptido señal (péptido señal IFN-beta) se especifica en el SEQ ID NO: 10.

10 El sIFNbeta-IgGFcmut de acuerdo con la presente invención es la proteína referida en la presente memoria como "Compuesto 1". El Compuesto 1 es el sIFNbeta-IgGFcmut de la invención y consiste en el SEQ ID NO: 3 y el SEQ ID NO: 8. El Compuesto 1 tiene cinco mutaciones en su dominio Fc para inhibir las actividades ADCC y CDC (numeración de acuerdo con el dominio de la cadena pesada de IgG humana convencional o la posición del índice de EU): L234A (L14A de los SEQ ID NO: 3 y 5; L180A de los SEQ ID NO: 8 y 10), L235E (L15E de los SEC ID NO: 3 y 5; L181E de los SEC ID NO: 8 y 10), G237A (G17A de los SEC ID NO: 3 y 5; G183A de los SEC ID NO: 8 y 10), A330S (A110S de los SEQ ID NO: 3 y 5; A276S de los SEQ ID NO: 8 y 10) y P331S (P111S de los SEQ ID NO: 3 y 5; P277S de los SEQ ID NO: 8 y 10). El dominio Fc del Compuesto 1 deriva del alotipo "marcador G1M (no 1)" (véase el Ejemplo 1).

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido, p. ej. un ADN, que codifica un sIFNbeta-IgGFcmut de acuerdo con la presente invención, los vectores y más concretamente los vectores de expresión que contienen dicho polinucleótido.

- 20 En una realización, el polinucleótido codifica el SEQ ID NO: 3, el SEQ ID NO: 8, el SEQ ID NO: 5 o el SEQ ID NO: 10. Preferiblemente, un polinucleótido comprende o consiste en el SEQ ID NO: 4 que codifica la primera subunidad de sIFNbeta-IgGFcmut (brazo Fcmut). Preferiblemente, un polinucleótido comprende o consiste en el SEQ ID NO: 9 que codifica la segunda subunidad de sIFNbeta-IgGFcmut (brazo IFNbeta-Fcmut). Preferiblemente, un polinucleótido comprende o consiste en el SEQ ID NO: 6 que codifica la primera subunidad de sIFNbeta-IgGFcmut (brazo Fcmut) y un péptido señal (es decir, el péptido señal de la cadena ligera de IgK de ratón). Preferiblemente, un polinucleótido comprende o consiste en el SEQ ID NO: 11 que codifica la segunda subunidad de sIFNbeta-IgGFcmut (brazo IFNbeta-Fcmut) y un péptido señal (es decir, el péptido señal de IFN-beta humano).

En una realización, un ADN de acuerdo con la invención comprende un promotor bidireccional. Preferiblemente, el promotor bidireccional es un promotor de CMV bidireccional de ratón.

- 30 Más preferiblemente, un polinucleótido de la invención comprende o consiste en el SEC ID NO: 12, también referido en la presente memoria como vector C370 (Figura 11). Dicho vector contiene las secuencias de ADN que codifican el Compuesto 1 (es decir, el SEC ID NO: 6 y el SEQ ID NO: 11).

En otro aspecto, la invención proporciona una célula anfitriona que contiene, por ejemplo como resultado de una transfección, un vector de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la presente invención.

- 35 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un sIFNbeta-IgGFcmut de acuerdo con la presente invención y su uso como medicamento, en particular para tratar la esclerosis múltiple.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria son útiles en el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento (local o sistémico) de la esclerosis múltiple.

- 40 El término "tratamiento" en el contexto de la presente invención hace referencia a cualquier efecto beneficioso sobre el progreso de la enfermedad, incluyendo la atenuación, la reducción, el descenso o la disminución del desarrollo patológico después de la aparición de la enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar con un portador farmacéuticamente aceptable.

- 45 Se pretende que la expresión "farmacéuticamente aceptable" abarque cualquier portador, que no interfiera en la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el anfitrión al que se administra. Por ejemplo, para la administración parenteral, la proteína o proteínas activas pueden ser formuladas en una forma de dosificación unitaria para inyectables en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución de Ringer.

- 50 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. En otro aspecto, la invención describe un método para tratar una enfermedad en un paciente, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la enfermedad se selecciona entre leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, leucemia mielógena crónica, esclerosis múltiple, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, VIH y/o infecciones causadas por virus seleccionados entre virus de Epstein-Barr, virus del herpes y/o virus del papiloma. Más preferiblemente, la enfermedad es la esclerosis múltiple. En una realización, la enfermedad es esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR).

- 5 En otro aspecto, la invención describe el uso de un sIFNbeta-IgGFcmut acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la leucemia de células pilosas, el sarcoma de Kaposi, la leucemia mielógena crónica, la esclerosis múltiple, la hepatitis A, la hepatitis B, la hepatitis C, el VIH y/o las infecciones causadas por virus seleccionados entre el virus de Epstein-Barr, el virus del herpes y/o el virus del papiloma.
- En un primer uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra por vía pulmonar.
- En un segundo uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra por vía intranasal.
- 10 En un tercer uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra mediante inhalación.
- En un cuarto uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra por vía oral.
- 15 En un quinto uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra por vía intravenosa o intramuscular.
- En una realización preferida, en un uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra por vía subcutánea.
- Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra de acuerdo con una cualquiera de las rutas descritas anteriormente diariamente o en días alternos.
- 20 Si se administra por vía subcutánea o intramuscular, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra una, dos o tres veces por semana, pero más preferiblemente cada dos semanas.
- Para su administración parenteral (por ejemplo intravenosa, subcutánea, intramuscular), una composición farmacéutica de la invención se puede formular como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación se esteriliza mediante técnicas utilizadas comúnmente.
- 25 Los ingredientes activos de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención pueden ser administrados a un individuo de varias maneras. Las rutas de administración pueden incluir las rutas intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, epidural, tópica, oral y preferiblemente mediante administración en aerosol, ruta intranasal o mediante inhalación. Se puede utilizar cualquier otra ruta de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo la absorción a través de los tejidos epiteliales o endoteliales o mediante terapia génica en la que se administra al paciente (por ejemplo, mediante un vector) una molécula de ADN que codifica el agente activo, que hace que el agente activo sea expresado y secretado *in vivo*. Además, una composición farmacéutica según la invención se pueden administrar junto con otros
- 30 componentes de agentes biológicamente activos tales como agentes tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.
- Preferiblemente, en un uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es liberada por medio de un dispositivo de pulverización, aerosol o inhalador. En una realización, una composición farmacéutica de la invención se pueden administrar utilizando dispositivos reconocidos. Los ejemplos que comprenden sistemas de un solo vial incluyen dispositivos auto-inyectables o de pluma inyectora para el suministro de una solución tal como Rebiject®.
- 40 En otro aspecto, la invención describe un dispositivo, en el que el dispositivo comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el dispositivo es un dispositivo de pulverización.
- La dosis administrada, en forma de una dosis única o múltiple, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, la vía de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), el grado de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.
- 45 Se pretende que la expresión "uso multi-dosis" incluya el uso de un solo vial, ampolla, o cartucho de una composición farmacéutica, un sIFNbeta-IgGFcmut de la invención para más de una inyección y/o inhalación, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o más inyecciones y/o inhalaciones. Las inyecciones y/o inhalaciones se realizan preferiblemente durante un período de al menos o alrededor de 12 horas, 24 horas, 48 horas, etc., preferiblemente hasta un período de, o alrededor de, 12 días. Las inyecciones y/o inhalaciones pueden estar espaciadas en el tiempo, por ejemplo, por un período de 6, 12, 24, 48 o 72 horas.
- 50

En una realización, en un uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra a una dosis de aproximadamente 30 a 120 µg de sIFNbeta-IgGFcmut por persona por día.

Preferiblemente, en un uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se dosifica a 1, 5, 8, 10, 12, 15, 20 o más µg de sIFNbeta-IgGFcmut/kg por inhalación.

- 5 Preferiblemente, en un uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra a una dosis de alrededor de 30 a 10.000 µg de sIFNbeta-IgGFcmut por persona por día o alrededor de 60 a 2.000 µg de sIFNbeta-IgGFcmut por persona por día o alrededor de 90 a 1000 µg de sIFNbeta-IgGFcmut por persona por día.

- 10 En una realización, en un uso de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se dosifica al menos a 107, más preferiblemente al menos a 157 µg de sIFNbeta-IgGFcmut s.c. por administración.

En lugar de referirse al peso (µg) de sIFNbeta-IgGFcmut, la dosis puede ser calculada en cantidades equivalentes de IFN-beta.

- 15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para elaborar un sIFNbeta-IgGFcmut acuerdo con la invención, comprendiendo el método cultivar una célula anfitriona de acuerdo con la invención y aislar el sIFNbeta-IgGFcmut de acuerdo con la presente invención.

- 20 La anterior descripción de las realizaciones específicas revelará por tanto plenamente la naturaleza general de la invención que otros, aplicando el conocimiento dentro de la capacidad de la técnica (incluyendo el contenido de las referencias citadas en la presente memoria), pueden modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones tales realizaciones específicas, sin experimentación indebida, sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, se pretende que tales adaptaciones y modificaciones se encuentren dentro del significado de un intervalo de equivalentes de las realizaciones descritas, basándose en la enseñanza y la orientación presentada en la presente memoria. Se debe entender que la fraseología o terminología de la presente memoria tiene un propósito descriptivo y no limitante.

25 Descripción de las figuras

La Fig. 1 describe una de realización de la invención y es una representación esquemática de las dos subunidades de un sIFNbeta-IgGFcmut. La Fig. 1a muestra las cinco mutaciones en los brazos Fc de un sIFNbeta-IgGFcmut numeradas de acuerdo con la posición del índice de EU y sus efectos. La Fig. 1b representa un sIFNbeta-IgGFcmut y aclara los nombres de las subunidades.

- 30 La Fig. 2 describe una realización de la invención y representa un alineamiento de secuencia de las mutaciones de aminoácidos introducidas en el brazo Fcmut del Compuesto 1 (es decir, SEC ID NO: 3) mediante mutagénesis dirigida al sitio en comparación con la porción equivalente del dominio Fc derivado de un clon de ADNc obtenido a partir de un clon MGC/consorcio Imagen (HFC de PEAK8, un alotipo "marcador G1M (no 1)"). La numeración se basa en el SEQ ID NO: 3. Las primeras tres mutaciones reducen la ADCC mientras las dos últimas reducen la CDC.
- 35 Las mutaciones L14A (es decir, L234A de acuerdo con el índice de EU), L15E (es decir, L235E de acuerdo con el índice de EU) y G17A (es decir, G237A de acuerdo con el índice de EU) eliminan la unión a los receptores de Fc FcγRI, IIA, IIB y IIIA, mientras que las mutaciones A110S (es decir, A330S de acuerdo con el índice de EU) y P111S (es decir P331S de acuerdo con el índice de EU) eliminan la unión de la proteína C1q iniciadora de la cascada del complemento.

- 40 La Fig. 3 describe una realización de la invención y representa un alineamiento de secuencias entre el brazo Fcmut del Compuesto 1 (es decir, SEC ID NO: 3), la porción correspondiente del Compuesto 2 (es decir, SEQ ID NO: 14. El Compuesto 2 es una proteína monómero-dímero que contiene una secuencia conectora de 8 aminoácidos entre el IFN-β y el dominio Fc y contiene sólo 1 mutación en el dominio Fc) y la región constante de cadena pesada del alotipo "marcador G1M (no 1)" (es decir, SEC ID NO: 1). La numeración se basa en el SEQ ID NO: 1. "." indica las posiciones de aminoácidos donde el SEC ID NO: 3 difiere de los SEQ ID NO: 1 y 14. ":" Indica las posiciones de aminoácido en donde el SEQ ID NO: 14 difiere de los SEQ ID NO: 1 y 3.
- 45

- La Fig. 4 describe una realización de la invención y representa un alineamiento de secuencias entre el brazo IFNbeta-Fcmut del Compuesto 1 (es decir, SEQ ID NO: 8), la porción correspondiente del Compuesto 2 (es decir, SEC ID NO: 15) y el IFN-β humano (Número de acceso UniProt P01574). "↓", indica las posiciones en las que el brazo IFNbeta-Fcmut se ha mutado. "#" indica la posición en la que el SEC ID NO: 15 se ha mutado. "§" indica las posiciones que caracterizan a los dos alotipos diferentes sobre los que se han construido los Compuestos 1 y 2.
- 50

- La Fig. 5 describe una realización de la invención y es un ensayo antiviral mediante el método WISH/VSV [células WISH de la línea celular de amnion humana contra el efecto citopático (ECP) del virus de la estomatitis vesicular (VSV)]. Las curvas corresponden a las curvas dosis-respuesta del Compuesto 1, el Compuesto 2 e IFN-β-1a humano recombinante. Los datos se presentan como el porcentaje de inhibición del efecto citopático.
- 55

La Fig. 6 describe una realización de la invención y es un ensayo antiproliferativo de células WISH. Las curvas corresponden a las curvas dosis-respuesta del Compuesto 1, el Compuesto 2 e IFN-β-1a humano recombinante. Los datos se presentan como el porcentaje de crecimiento celular.

5 La Fig. 7 describe una realización de la invención y es un Análisis del Gen Informador ("RGA por Reporter Gene Assay") en células Vero. Las curvas corresponden a las curvas dosis-respuesta del Compuesto 1, el Compuesto 2 y IFN-β-1a humano recombinante. Los datos se presentan como el porcentaje de las cuentas por segundo (cps).

La Fig. 8 describe una realización de la invención y muestra la unión relativa del compuesto 1 y el Compuesto 2 a células IIA1.6 transfectadas con CD64.

10 La Fig. 9 describe una realización de la invención y muestra la unión de C1q al Compuesto 1 y al Compuesto 2. La Fig. 9a incluye IgG1. La Fig. 9b excluye IgG1.

La Fig. 10 describe una realización de la invención y presenta la Media (DT) de los perfiles en suero de IFN-β, el Compuesto 1 o el Compuesto 2. Las curvas corresponden a: los niveles en suero de IFN-β después de la administración subcutánea (SC) de 55 pmoles/kg Rebif®; los niveles en suero del Compuesto 1 después de la administración del Compuesto 1 vía inhalación (Inh.) a la dosis consignada nominal de 138 pmoles/kg; y los niveles en suero del Compuesto 2 después de la administración del Compuesto 2 vía inhalación a la dosis consignada nominal de 138 pmoles/kg.

La Fig. 11 describe una realización de la invención y presenta el vector de expresión C370 utilizado para producir el Compuesto 1.

A continuación la presente invención se ilustra por medio de los siguientes ejemplos.

20 Ejemplos

Protocolos analíticos utilizados para la caracterización

1. RP-HPLC

HPLC: Sistema Agilent de la serie 1100 (Agilent Technologies)

Columna: Aquapore BU-300 30x2,1 mm (Brownlee 0711-0062)

25 Disolvente A: TFA al 0,1% en agua

Disolvente B: TFA al 0,1% en acetonitrilo al 90%

Gradiente : ProtC4

Preparación de la muestra:

15 µg inyectados

30 Disolver la proteína en el disolvente A hasta un volumen final de 100 µl

2. SDS-PAGE

Gel: NuPage Bis-Tris 4-12% (Invitrogen NP0322)

Tampón: Tampón de migración NuPage MES SDS (Invitrogen NP0002)

10x tampón de muestra concentrado.

35 añadir DTT 10 mM para las condiciones reducidas

Condiciones de migración: 200 V 40 min

Preparación de la muestra:

Cargar 10 µg

Disolver la proteína en 10x tampón de muestra a un volumen final de 20 µl

40 Calentar durante 5 min a 95°C

Colorear en Azul de Coomassie al 0,1%, metanol al 30%, ácido acético al 10%, 45 min.

Decolorar en metanol al 30%, ácido acético al 10%

3. IEF

Gel: gel IEF de pH 3-10 (Invitrogen ECC6655A)

45 Tampones: Tampón Ánodo IEF (Invitrogen LC5300

Tampón Cátodo IEF (Invitrogen LC5310)

tampón de la muestra IEF de pH 3-10 (Invitrogen LC5311)

Preparación de la muestra:

Cargar 10 µg

Diluir la muestra con un volumen de tampón de muestra IEF (No calentar las muestras)

- 5 Condiciones de migración: 1 h a 100V
1 h a 200 V
2 h a 400 V

Fijar el gel en metanol al 30%, ácido acético al 10% 2 x 30 min.

Colorear en Azul de Coomassie al 0,1%, metanol al 30%, ácido acético al 10%, 15 min.

Decolorar en metanol al 30%, ácido acético al 10%

10 **4. Transferencia Western**

Solución de bloqueo: PBS/Triton X-100 al 0,1%, Leche al 5%

Solución de lavado: PBS/Triton X-100 al 0,1%

Solución de anticuerpos: Diluir anticuerpo en solución de lavado.

Bloquear 1-2h a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C

- 15 Lavar 3 x 5 minutos

Incubar con el 1^{er} anticuerpo 1 hora a temperatura ambiente

Lavar 30 minutos

Incubar con el 2^o anticuerpo 1 hora a temperatura ambiente

Lavar al menos 1 hora.

- 20 Detección de la transferencia Western mediante ECL: seguir el procedimiento proporcionado con el reactivo.

Anticuerpos

anti-Fc = anti-IgG humana de cabra, Fragmento Fc HRP (10000xdil.) (Jackson 109-036-098)

anti-IFN-beta =

1^{er} anticuerpo: mAb anti-IFN-beta 117,1 0,1 µg/ml

- 25 2^o anticuerpo: anti-IgG de ratón de cabra HRP (1000xdil.) (Dako P0447)

5. Desglicosilación

N-glicosidasa F (Roche 11 365 193 001)

10 µg de sIFNbeta-IgGFcmut en tampón fosfato de pH 7,5/acetronitrilo al 10%

añadir 5U de PNGasa F

- 30 Incubar durante la noche a 37°C

6. Reducción después de la desglicosilación

Incubación de la muestra en HCl-guanidina 4M, DTT 10 mM, 1 hora a 56°C

7. Secuenciación N-terminal

Cargar 200 pmol

- 35 La muestra se carga en un cartucho Prosorb (ABI 402052) antes de ser secuenciada.

(El cartucho Prosorb está diseñado para la rápida concentración y limpieza de las muestras diluidas de proteínas sobre una matriz adecuada para la secuenciación (membrana de PVDF)).

Equipo:

- 40 Sistema de microsecuenciación Procise Modelo 494 en línea con una HPLC Microgradient 140C (Applied Biosystems).

8. Análisis de aminoácidos

El análisis de aminoácidos se lleva a cabo mediante hidrólisis en fase gaseosa a vacío en atmósfera de nitrógeno durante 24 h en HCl 6N que contiene 1 mg/ml de fenol a 112°C.

- 45 El Ácido Alfa-Amino Butírico (AABA) está incluido en los productos hidrolizados como un patrón interno.

Las muestras se analizan por duplicado.

Los aminoácidos hidrolizados se cuantifican utilizando el paquete químico Waters AccQ. Tag.

Waters AccQ.Tag

Ésta es una técnica de derivatización pre-columna.

- 50 Los AA derivados se separan mediante RP-HPLC y se cuantifican mediante detección de la fluorescencia.

Se realiza un nivel de calibración de 3 (20, 50 y 100 picomoles)

Material

i) Hidrólisis de Proteínas:

- 5 Ensamblaje de los viales de reacción (Waters WAT007363)
 Tubos de muestra (Waters WAT007571)
 Estación de trabajo Pico.Tag (Waters WAT007370)

ii) Derivatización, Separación y Cuantificación de AAA:

- 10 HPLC: Sistema Agilent de la serie 1090 (Agilent Technologies)
 Detector: FLD G1321A Agilent de la serie 1100 (Agilent Technologies)
 Excitación: 250 nm Emisión: 395 nm
 Columna: AccQ.Tag C18 4 µm 3,9 m x 150 mm (Waters WAT052825)
 Disolvente A: 900 ml de H₂O + 90 ml de AccQ.Tag Eluent A Concentrate (WAT052890)
 Disolvente B: Acetonitrilo al 60% (Baker, 9017) en H₂O

15 Gradiente HPLC:

Tiempo [min]	%B	Flujo	[ml/min]
	0,50	2,0	1,000
	15,00	7,0	1,000
	19,00	10,0	1,000
20	32,00	33,0	1,000
	33,00	33,0	1,000
	34,00	100,0	1,000
	37,00	100,0	1,000
	38,00	0,0	1,000
25	50,00	0,0	1,000

9. EM MALDI-TOF

Se realizaron análisis de espectrometría de masas en un espectrómetro de masas Voyager DE-PRO MALDI-TOF (Applied Biosystems) manejado en el modo lineal.

Se utilizó ácido sinapínico como molécula de absorción de energía.

- 30 Las muestras de proteína purificada se suspendieron en una solución de TFA al 0,1% a una concentración de 1 mg/ml. Se aplicó 1 µg de proteína en el soporte de la muestra. Se añadió 1 µl de una solución saturada de ácido sinapínico (acetonitrilo al 50% en H₂O, más TFA al 0,1%) en la parte superior de la gotita de proteína y se dejó secar a temperatura ambiente.

La calibración de masas se realizó para cada análisis utilizando patrones de calibración de ABI.

35 10. Método SE-HPLC

- HPLC: Waters Alliance 2695
 Fase móvil: Fosfato de Sodio 50 mM + NaCl 500 mM a un pH final de 7,5
 Columna: Superdex 200 10/300GL a temperatura ambiente. La columna se debe utilizar en posición vertical.
 40 Velocidad de flujo: de 500 µl/min a 750 µl/min (con presión máxima por debajo de 14,77 Kg/cm² "210 psi")
 Cargador de muestras automático: Waters Alliance 2695 a 5°C
 Detección: Waters Fluorescence 2475 (con emulación 474 en Empower Software), con excitación a 280 nm, emisión a 348 nm, ventana de 18 nm, Ganancia 100, Atenuación 1.
 45

Ejemplo 1

- 50 La proteína de la invención es el sIFNbeta-IgGFcmut referido como Compuesto 1. En el Compuesto 1 una subunidad (brazo IFNbeta-Fcmut, SEQ ID NO: 8) es el producto de fusión de IFN-β y un brazo Fc mutado del dominio Fc de IgG1 humana. La otra subunidad (brazo Fcmut, SEQ ID NO: 3) es idéntica a la porción Fc sola de la primera subunidad. La secuencia de la porción Fc presente en ambas subunidades se ha modificado sustituyendo en un alotipo "marcador G1M (no 1)" cinco aminoácidos con el fin de reducir las funciones efectoras de la inmunoglobulina (Figuras 1, 3 y 4). Una proteína monómero-dímero de IFN-beta descrita en el documento WO 2005/001025, en adelante referida como "Compuesto 2", se ha preparado con fines comparativos. El Compuesto 2 contiene una secuencia conectora de 8 aminoácidos entre el IFN-β y el dominio Fc y contiene sólo 1 mutación (es decir, N297A de

acuerdo con la posición del índice de EU) en el dominio Fc en comparación con la secuencia de Fc derivada de un alotipo de IgG1 diferente (Figura 4).

La subunidad de Compuesto 2 no ligada a IFN-beta se especifica en SEQ ID NO: 15. La subunidad de Compuesto 2 ligado a IFN-beta a través de un conector de 8 aminoácidos se especifica en el SEC ID NO: 16.

- 5 La elaboración del Compuesto 1 ha sido establecida mediante la generación de un clon en células CHO-S cultivadas en ausencia de suero. Las células CHO-S derivan de ovarios de hámster chino y están adaptadas al cultivo en suspensión sin suero (Invitrogen/Gibco, La Jolla, CA).

1. Clonación

10 El vector de expresión C370 (Figura 11; la secuencia del vector C370 se especifica en el SEQ ID NO: 12) utilizado para producir el Compuesto 1 contiene un promotor murino bidireccional de CMV (IE1 e IE2). La secuencia de codificación de IFN-beta se obtuvo mediante PCR de ADN genómico humano. Se obtuvo un clon de ADNc de la cadena pesada de IgG1 (un alotipo "marcador G1M (no 1)") de un clon MGC/consorcio Imagen derivado de una genoteca de ADNc de bazo humano. El dominio Fc de IgG1 humana mutado (IgGFcmut) se obtuvo mediante PCR de un plásmido PEAK8 que contenía el dominio Fc del alotipo "marcador G1M (no 1)", en el que el dominio Fc se mutó en dos etapas utilizando el sistema de mutagénesis Quik Change II (Stratagene). Se introdujeron varias sustituciones de aminoácidos individuales en el dominio Fc para mutar aminoácidos críticos para mediar en la ADCC/CDC (Figuras 2 a 4). En la primera etapa, la secuencia que codifica los aminoácidos ¹¹⁷LLGG¹²⁰ del SEQ ID NO: 1 (es decir ²³⁴LLGG²³⁷ del índice de EU) se mutó a ¹¹⁷AEGA¹²⁰. En la 2ª etapa, la secuencia que codifica los aminoácidos A213 (es decir A330S de del índice de EU) y P214 (es decir P331 del índice de EU) del SEC ID NO: 1 se mutó a S213 y S214. Se generó un ADNc que codificaba el IFN-beta, incluyendo su secuencia del péptido señal cognada, en marco con un brazo Fc mutado del sIFNbeta-IgGFcmut mediante PCR solapante y se subclonó aguas abajo del promotor IE1. Se generó un ADNc que codificaba la secuencia del péptido señal de la cadena ligera de IgK de ratón fusionada a la secuencia codificante del otro brazo Fc mutado del sIFNbeta-IgGFcmut mediante PCR y se subclonó aguas abajo del promotor IE2 (Figura 11).

25 2. Construcción de vectores de expresión

El gen de fusión del brazo IFNbeta-Fcmut fue generado de este modo mediante PCR recombinante y se clonó en un vector de expresión para la expresión constitutiva de alto nivel en células CHO. El vector final C370 contiene un promotor de CMV bidireccional de ratón.

30 La presión de selección estaba vinculada a la secuencia codificante del brazo Fcmut con el fin de tener un equilibrio favorable del dímero de IFN-beta con respecto a sIFNbeta-IgGFcmut, permitiendo así una más fácil eliminación del dímero de IFN-beta durante la purificación DSP. El promotor bidireccional de CMV de ratón conduce la expresión de las dos cadenas del Compuesto 1. La selección está relacionada con la expresión del brazo Fcmut utilizando un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) de poliovirus. La unidad de expresión está protegida de la represión de la cromatina cercana en el sitio de integración al azar mediante el uso de secuencias aisladoras.

35 3. Preparación de ADN para la transfección

El ADN plasmídico para la transfección se preparó para garantizar la Calidad de Transfección Estable. Se transformaron bacterias DH5α (Invitrogen, Núm. de Cat. 18265-017) con el ADN del plásmido original de acuerdo con el protocolo del proveedor, y se seleccionaron en presencia de 100 µg/ml de ampicilina. Se recogió una sola colonia; las células se cultivaron a lo largo del día en 1 ml de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se amplificaron en un cultivo de 100 ml durante la noche. El ADN del plásmido se aisló como se describe en el manual del kit Nucleobond PC 500 EF (Macherey-Nagel, Núm. de cat. 740550). La calidad del ADN aislado se evaluó midiendo la DO₂₆₀ y la DO₂₈₀ y se calculó la razón DO₂₆₀/DO₂₈₀ que tiene que ser mayor de 1,8. La identidad del plásmido se verificó digiriendo el ADN con 4 enzimas de restricción en reacciones independientes. Las regiones codificantes para el brazo Fcmut y para el brazo IFNbeta-Fcmut fueron secuenciadas en ambas orientaciones antes de la transfección. Además, el ADN plásmido se linealizó con una enzima apropiada cortando en la cadena principal del vector.

El vector C370 se linealizó con *ClaI* (1,255 µg/µl).

4. Origen de la célula anfitriona y procedimientos de cultivo normalizados

50 Las células CHO-S se obtuvieron de Invitrogen. Las células CHO-S no transfectadas se cultivaron en medio ProCHO5 (Bio Whittaker, Núm. de cat. 12-7660) con un suplemento de L-glutamina 4,5 mM (Sigma, Núm. de cat. G7513). La transfección se llevó a cabo en el medio antes descrito. Para la selección, se utilizó ProCHO5 con un suplemento de L-glutamina 4,5 mM y 10 µg/ml de puomicina (Sigma, Núm. de cat. P-7255). Las líneas celulares se cultivaron en suspensión y se incubaron a 37°C en una incubadora que contenía CO₂ al 5% en frascos T75 o en matraces Erlenmeyer (135 ml) sacudidos a 130 rpm. Generalmente las células se hicieron pasar por dilución a 0,2 x 10⁶ células viables/ml 2-3 veces por semana.

5. Congelación, descongelación y cultivo de células

Usualmente, se congelaron $5-10 \times 10^6$ células viables por vial. La cantidad requerida de células se centrifugó y se resuspendió en 0,5 ml de medio ProCHO5. A continuación, se añadieron 0,5 ml de Medio de Congelación ProCHO5 (Bio Whittaker, Núm. de cat. 12-768E), con un suplemento de DMSO al 15% (Sigma). Las células se congelaron a -80°C , y a continuación se transfirieron a un tanque de almacenamiento refrigerado con nitrógeno.

Para la descongelación, se colocó una ampolla en un baño de agua a 37°C . A continuación, las células se transfirieron a 10 ml del medio ProCHO5 precalentado, se centrifugaron a 800g durante 3 min, y a continuación se resuspendieron en medio de nueva aportación de $0,2$ a $0,4 \times 10^6$ células/ml en un matraz T75.

Las células se pasaron 2 o 3 veces por semana diluyendo el cultivo a $0,2 \times 10^6$ células viables/ml. En matraces T75 las células se cultivaron en 10 - 20 ml de medio y en matraces Erlenmeyer en 35 ml de medio.

6. Transfecciones estables

El día antes de transfección, las células CHO-S, que crecen en medio ProCHO5 con un suplemento de L-glutamina 4,5 mM, se diluyeron a $0,7 \times 10^6$ células viables/ml. La transfección se realizó mediante electroporación (400V, 250 μF), 12 min de CHO-S, 10 mg (8 μl) de C370.

7. Selección

Cuarenta y ocho horas después de la transfección se contaron las células, el medio gastado se separó mediante centrifugación, y las células se diluyeron a continuación a $0,5 \times 10^6$ células viables/ml en medio de selección (ProCHO5 con un suplemento de L-glutamina 4,5 mM y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puomicina). El medio se cambió cada dos días. Las densidades celulares se controlaron a lo largo del tiempo y, cuando el número de células viables se redujo por debajo de $0,1 \times 10^6$ células/ml, las células se concentraron en un volumen menor. Por otra parte, cuando el número de células viables aumentó, las células se diluyeron a $0,4-0,5 \times 10^6$ células/ml. Este procedimiento se repitió hasta que la viabilidad de la reserva alcanzó 90%. Las reservas obtenidas se analizaron a continuación para determinar la productividad (título y picogramos por célula por día, pcd) y la actividad biológica (bioanálisis), y se utilizaron directamente para aislar protoclones.

8. Aislamiento de protoclones

Las reservas de células transfectadas establemente se diluyeron a 1 célula por pocillo (en 70 μl) en medio de selección con un suplemento de 0,3% (v/v) de solución de rojo fenol al 0,5% (Sigma, Núm. de cat. P0290) y se cultivaron en placa en placas de 384 pocillos con la ayuda de un robot dispensador Multidrop (Thermo Labsystems). Dos semanas después de la siembra, se recogieron los protoclones independientes y se redispusieron en placas de 96 pocillos en 200 μl de medio apropiado desprovisto de agentes selectivos. Se aislaron 300 protoclones para cada reserva. Las células se diluyeron una vez a la semana 20 veces, en un formato de 96 pocillos, con la ayuda de un robot Beckman Biomek 2000.

9. Aislamiento y evaluación de los clones

El cultivo del protoclón se diluyó hasta una concentración de 0,4 células por pocillo (en 70 μl) en un medio adecuado con un suplemento de 0,3% (v/v) de rojo fenol y a continuación se cultivó en placa en placas de 384 pocillos con la ayuda de un robot dispensador Multidrop. De cuatro a 5 días después de la siembra, se examinó el crecimiento en cada pocillo al microscopio, y los pocillos con un solo clon en crecimiento se marcaron. Para asegurar la clonalidad, se contó el número de pocillos con células en crecimiento y tuvo que ser inferior a 33% de toda la placa. Al cabo de 15 días de crecimiento, los clones seleccionados se transfirieron a placas de 24 pocillos, se expandieron, y a continuación se analizaron seis clones para cada protoclón inicial para determinar la productividad con un ensayo Biacore cuantitativo. Se evaluaron el título y la productividad específica en pulsos de 24 horas en matraces T75. Los 4 mejores clones se escogieron y se analizaron adicionalmente en experimentos en matraces sacudidos.

Como alternativa al método Biacore, se pueden utilizar RP-HPLC y SE-HPLC como métodos analíticos.

10. Medición de la productividad

Se midieron la productividad y la concentración específica de proteína en pulsos de 24 horas. Para esto, las células se resuspendieron a $0,8 \times 10^6$ células viables/ml en 10 ml de medio de nueva aportación (matraz T75 sacudido a 60 rpm). Después de 24 horas, las células se contaron y se recogió 1 ml del cultivo para someter a ensayo la concentración de proteína mediante un análisis Biacore específico de IFN- β . La productividad específica (expresada como picogramos por célula por día, pcd) se calculó como título (mg/l) / densidad celular media entre el comienzo y el final del pulso (referido como células por ml) / duración del pulso (1 día). En experimentos en matraces sacudidos, el pcd se calculó como una función de IVC a lo largo de un período de tiempo definido.

11. Análisis mediante SDS-transferencia Western

El análisis mediante transferencia Western se realizó en sobrenadantes de cultivo. En resumen, las muestras de proteínas se separaron en geles de acrilamida en gradiente de 8-18% de 1 mm de espesor, y la electroforesis se realizó a corriente constante (30 mA) a 4°C seguido por transferencia a una membrana de PVDF. Se utilizó un anticuerpo monoclonal o Fc anti-IFN β para la detección epítipo.

12. Análisis mediante transferencia Northern

El ARN total se aisló de 8×10^6 células de acuerdo con el protocolo RNeasy MiniKit (Qiagen, Núm. de cat. 74104). Las transferencias Northern se prepararon utilizando el kit NorthernMax™-Gly (Ambion, Núm. de cat. 1946) según el protocolo del proveedor. Se cargaron 100 ng de ARN por pocillo, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 1%) y se transfirieron hacia abajo a una membrana BrightStar-Plus (Ambion, Núm. de cat. 10102) utilizando el kit Turboblotter (Schleicher & Schuell, Núm. de cat. 10416328). Se utilizaron 10 μ g de escalera de ARN (Invitrogen, Núm. de cat. 15620-016) como marcador de tamaño. El ARN se inmovilizó mediante entrecruzamiento UV (Stratalinker) y se coció (10 min, 70°C). El marcaje de la sonda con DIG y la hibridación (a 68°C) se realizaron utilizando el Kit DIG Northern Starter (Roche, Núm. de cat. 2039672) según el protocolo del proveedor. Se utilizaron 100 ng/ml de la sonda de ARN para la hibridación. La sonda se preparó usando el protocolo de transcripción *in vitro* convencional con ARN polimerasa de T3.

El patrón obtenido se reveló mediante la exposición de la membrana a Hyper Film (Amersham Pharmacia Biotech, Núm. de cat. RPN2103K) o mediante la adquisición de una imagen con Chemi Doc. (BioRad).

Ejemplo 2

1. Expresión

Para producir 60 mg del Compuesto 1, se aplicó un procedimiento de cultivo genérico a escala de 5 L en biorreactores. La línea celular (un clon) es CHO-S y se cultivó en ausencia de suero, en modo "lote alimentado en bolo" (cultivo discontinuo con adiciones individuales). Fueron necesarias dos rondas para producir la cantidad requerida.

Las células se amplificaron en matraces sacudidos para crear el inóculo de cada biorreactor. La amplificación pasó por matraces sacudidos de 125 ml, 500 ml y 1000 ml cargados respectivamente con 30 ml, 200 ml y 500 ml de medio. El biorreactor de 5L contenía un volumen final de 3L, incluyendo el volumen de inóculo y las alimentaciones.

El medio de mantenimiento utilizado en todas las etapas fue el ProCHO5 de Cambrex (Bélgica) con un suplemento de L-glutamina 4,5 mM.

Se aplicaron dos alimentaciones de bolo. La primera, F1, contenía 0,68 g/L de hipoxantina de 0,68 g/L, 0,194 g/L de timidina de 0,56 g, 42 mg/L de L-cisteína-HCl, ácido fólico 0,5 mM y L-glutamina 4,5 mM (concentraciones finales). F1 se aplicó el día 2 después de la inoculación. La alimentación F2 se realizó con L-glutamina 4,5 mM, con o sin 5 g/L de glucosa (concentraciones finales). La glucosa se añadió en F2 sólo cuando la cantidad de glucosa residual en el medio fue inferior a 3 g/L.

Las configuraciones del cultivo fueron las siguientes:

- temperatura = 37°C, baja a 32°C a la densidad celular máxima,
- agitación = 100 rpm, aumenta a 120-130 rpm después de la primera alimentación,
- pH máximo = 7,3. La alcalinización se controló mediante la adición de CO₂.
- PO₂ = 50% de saturación.

Las concentraciones celulares en la inoculación y durante la cosecha al cabo de 6 días de cultivo fueron respectivamente $4,0 \times 10^5$ y $3,4 \times 10^6$, con una viabilidad final de aproximadamente 72%.

Los parámetros de cultivo se midieron en línea y se regularon. Las mediciones fuera de línea incluyeron los recuentos de células, la evaluación de la viabilidad mediante azul tripán, la concentración de glucosa residual (analizador YSI, Yellow Springs Instruments) y el patrón de expresión de proteínas cualitativo a lo largo del tiempo.

2. Purificación

Se ha desarrollado un protocolo de purificación que aísla eficazmente la proteína sIFNbeta-IgGFcmut de las otras formas producidas.

Se estableció un procedimiento de purificación con el material generado cultivando una reserva de CHO inicial. Éste se aumentó a escala y se utilizó directamente para purificar los sobrenadantes de cultivo celular de los protoclones.

En la presente memoria, las moléculas etiquetadas con Fc serán referidas de la siguiente manera:

- "Dímero de Fc libre" (brazo Fcmut/brazo Fcmut)
- "sIFNbeta-IgGFcmut" (heterodímero de brazo Fcmut/brazo de INFbeta-Fcmut)
- "dímero de IFN-beta" (homodímero de INFbeta-brazo Fcmut/brazo de INFbeta-Fcmut)

5 La secuencia de purificación consiste en el enriquecimiento de "sIFNbeta-IgGFcmut" presente en los sobrenadantes, mientras se eliminan la mayoría de los contaminantes relacionados ("Dímero de Fc libre", "dímero de IFN-beta", formas truncadas y agregadas) y productos no relacionados (las proteínas del medio y secretadas por las células CHO). Una etapa de captura inicial sobre Proteína A une todas las moléculas etiquetadas con Fc. El eluato se aplica a continuación sobre un gel Blue Sepharose que se une preferiblemente a moléculas etiquetadas con IFN, y por lo tanto, se separa la mayor parte del "dímero de Fc libre".

Las dos etapas finales son una Cromatografía de Intercambio iónico seguida de una Cromatografía de Exclusión por Tamaño que se comportan como etapas de refinado y eliminan una parte significativa del "dímero de IFN-beta" y especies de alto peso molecular.

15 El proceso se ejecuta dos veces, cada vez con 3L de sobrenadante de cultivo celular como material de partida, para producir la cantidad requerida del Compuesto 1.

2.1. Etapa de captura sobre Proteína A

Después del equilibrado con PBS de la columna empaquetada con 53 ml de Mab Select Sure (GE Healthcare), la muestra se cargó durante la noche en la columna mediante la reducción de la velocidad de flujo lineal a 35 cm/h. A continuación, la columna se lavó con PBS hasta hacer que la señal de salida volviera a la inicial. La elución se llevó a cabo mediante una sola etapa a 100% de glicina 0,1 M de pH 2,7. El pico eluido se reunió y se cuantificó mediante UV utilizando un coeficiente de extinción molar de 100230 que da una $A_{280} = 1,38$ UA para una concentración de 1 mg/ml.

25 Las especies moleculares más abundantes del eluato (sIFNbeta-IgGFcmut, dímero de IFN-beta y dímero de Fc libre) tienen coeficientes de extinción molecular similares, que permiten una cuantificación directa por espectrofotometría UV.

A continuación, la solución se diluyó a 1,3 mg/ml en Glicina 0,1 M de pH 2,7 y se neutralizó inmediatamente mediante la adición de Tris 0,1 M al 20% (v/v) de pH 8.

2.2. Purificación en Blue Sepharose

30 Después de una etapa de intercambio de tampón en G25, se cuantificó el contenido de proteína y la solución se aplicó sobre gel Blue Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) en dos rondas paralelas. El sIFNbeta-IgGFcmut se une fácilmente al medio, mientras que la mayor parte del dímero de Fc libre se recupera en la fracción no retenida.

Un primer lavado con Tris-HCl 50 mM de pH 8,5 eliminó los residuos de la especie de dímero de Fc, y una primera etapa de elución con Tris-HCl 50 mM al 56% de pH 8,5 y 44% de una solución de propilenglicol al 45% + NaCl 1,4 M + Tris-HCl 50 mM de pH 8,5 eliminó algunos agregados y dímeros de IFN-beta. La segunda etapa de elución con 35 100% de tampón de propilenglicol al 45% + NaCl 1,4 M + Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 contenía principalmente sIFNbeta-IgGFcmut y algunos dímeros de IFN-beta.

2.3. Refinado en Q Sepharose Fast Flow

40 El eluato de la etapa de Blue Sepharose se sometió a intercambio de tampón en Tris 50 mM de pH 8,5, y se inyectó en una columna Q Sepharose Fast Flow. Después de una etapa de lavado con Tris 50 mM de pH 8,5, se aplicó un gradiente de sal llegando hasta NaCl 0,5 M + Tris 50 mM de pH 8,5. El pico grande y principal que contenía el sIFNbeta-IgGFcmut se recogió y se cuantificó mediante espectrofotometría UV.

Este eluato se aplicó luego a una unidad de filtro Centriprep de 10 kDa (Amicon) para concentrar el material antes de la etapa siguiente y final.

2.4. Refinado en Superdex 200

45 La solución de proteína se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño. Con el fin de mantener una alta resolución, el volumen de inyección se mantuvo al mínimo, haciendo obligatorias inyecciones múltiples. Como se especificó para formular la proteína en Tris 50 mM + NaCl 500 mM + glicerol al 10% de pH 7,5, el tampón utilizado para la filtración en gel fue Tris 50 mM de pH 7,5 + NaCl 500 mM. Únicamente se recogió la parte central del pico agudo con el fin de no contaminar la proteína de interés con los agregados y los dímeros de IFN-beta. A continuación, la proteína se concentró hasta 1 mg/ml en filtros Centriprep con un corte a 10 kDa y se añadió glicerol

50

al 10%. Finalmente, la solución se filtró sobre una membrana de 0,22 micras y se dividió en alcuotas. Los viales se almacenaron a -80°C.

La proteína final purificada está formada esencialmente por sIFNbeta-IgGFcmut. La forma de dímero libre de Fc es casi inexistente.

- 5 El protocolo de purificación puede entregar alrededor de 60 mg de Compuesto 1 purificado por 3 litros de sobrenadantes de cultivos celulares a partir del protocolo de CHO.

10 El análisis SDS-PAGE de sIFNbeta-IgGFcmut ha demostrado que ambos polipéptidos de la proteína están glicosilados (dominio Fc e IFN-beta) y unidos por enlaces disulfuro. El Compuesto 1 ha demostrado así un alto grado de pureza y actividad. La proteína final purificada se elabora esencialmente de sIFNbeta-IgGFcmut (la forma de dímero de Fc libre está casi ausente).

Ejemplo 3 - Productividad

La generación de una reserva que expresa el Compuesto 1 se realizó de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2. Después de la transfección y la selección, se sometió a ensayo la expresión de la molécula, utilizando un análisis Biacore desarrollado para medir el IFN-β.

- 15 La reserva se sometió a ensayo para determinar la secreción en pulsos de 24 horas, utilizando medio ProCH5. Se obtuvo una mayor productividad específica a una temperatura más baja.

Los protocolos se aislaron a partir de una distribución convencional a 1 célula/pocillo. Se seleccionaron alrededor de 300 protocolos y se sometieron a ensayo para determinar la productividad en un formato HTS.

20 Se sometieron a ensayo los mejores 15 protocolos a medida que se sometían a ensayo en el análisis HTS en el pulso de 24 horas en 6 pocillos y matraces T75 conduciendo a la selección de 3 protocolos candidato. Estos 3 protocolos se clonaron distribuyendo 0,4 células/pocillo. Para cada protocolo, se seleccionaron 20 clones; asegurándose de que la placa de la que fueron seleccionados cumplían los criterios de clonación estadísticos (<33% de recuperación, eliminación de cualquier pocillo con dos colonias después de la inspección visual).

25 Los clones se rastrearon por primera vez en el análisis HTS, y los cinco mejores de cada uno provenientes de cada protocolo se sometieron a ensayo adicionalmente en cultivos discontinuos en matraces con sacudimiento. La siembra inicial fue de $0,2 \times 10^6$ células viables/ml de cultivo en medio ProCHO5 a 37°C. El sacudimiento fue a 130 rpm. Los cultivos se detuvieron en WD7 cuando la viabilidad comenzó a disminuir. Los cultivos se sometieron a ensayo para determinar el número de células, la viabilidad, el título, y se realizó una SDS-WB para eliminar cualquier clon que mostrara un tamaño e integridad moleculares anormales. Los dos mejores clones mostraron títulos de hasta 40 mg/L y un PCD de alrededor de 4 a 37°C. La densidad celular fue razonable y el crecimiento fue vigoroso sin ningún signo de muerte celular temprana, y se detectó la molécula intacta en una transferencia SDS-WB.

30

Los dos mejores clones se seleccionaron y se volvieron a someter a ensayo adicionalmente en el matraz con sacudimiento con cambio de temperatura. Los resultados confirmaron los resultados iniciales obtenidos en los matraces con sacudimiento.

35 Se obtuvieron títulos de hasta 120 mg/L, según se detectó mediante un ensayo Biacore específico para IFN-β disminuyendo la temperatura. Esto se obtuvo usando un clon específico del que se deriva el Compuesto 1. Se observaron un crecimiento vigoroso y una viabilidad muy buena de las células en el lote. La productividad específica subió a 12 pdc. Este clon mostró de este modo un perfil ventajoso y muy buen potencial para el desarrollo de procedimientos para la producción material con Buenas Prácticas de Laboratorio/Buenas Prácticas de Fabricación (GLP/GMP en sus siglas Inglesas). La viabilidad y el crecimiento celular después de la descongelación se verificaron de acuerdo con el protocolo convencional. La prueba del Mycoplasma y de esterilidad se llevaron a cabo utilizando protocolos de acuerdo con la FDA.

40

Ejemplo 4 - Estabilidad y Solubilidad

4.1 Lote utilizado

- 45 El Compuesto 1 se diluyó 1:2 en el tampón original: fosfato de Na 50 mM + NaCl 500 mM + glicerol al 10% de pH 7,5. La concentración de proteína en los ensayos fue de 0,66 mg/ml.

4.2 Condiciones sometidas a ensayo

estabilidad térmica mediante SE-HPLC: - 1 semana a + 40°C

- 1 mes a + 5°C

- 50 - 1 mes a + 25°C

estabilidad de congelación/descongelación mediante SE-HPLC después de 1 y 5 ciclos (-20°C)

4.3 Resultados

A tiempo $t = 0$ la muestra tiene una concentración de sIFNbeta-IgGFcmut de >98,5%, con menos de 2% de HMW.

5 Después de 1 semana a +40°C, la concentración de sIFNbeta-IgGFcmut disminuye a aproximadamente 81%, con aproximadamente 19% de HMW.

Después de 1 mes a +5°C la concentración sIFNbeta-IgGFcmut es de aproximadamente 99%, con una ligera disminución en el contenido de HMW.

10 Después de 1 mes a +25°C, las dos muestras duplicadas mostraron, después de la incubación, la presencia de precipitado. Mediante análisis SEC, el pico esperado de sIFNbeta-IgGFcmut eluyó a un mayor tiempo de retención, y estuvieron presentes otros picos de menor MW. Un análisis adicional mediante SDS-PAGE y secuenciación N-terminal (por transferencia a membrana de PVDF después de Electroforesis en Gel-SDS) han confirmado la hipótesis de la hidrólisis cerca del sitio de fusión, y no se encontraron trazas de la secuencia de IFN-β.

Después de los 1 y 5 ciclos de congelación/descongelación el contenido de sIFNbeta-IgGFcmut es de alrededor de 98%.

15 4.4 Experimentos de congelación/descongelación

Las muestras se diluyen a las concentraciones de ensayo y se almacenan a +4°C durante al menos 24 horas para el equilibrado.

A continuación, después de medir el perfil de SEC a $t = 0$, las muestras se almacenan a -20°C durante al menos un día, después se descongelan a +4°C (durante al menos un día) y a continuación se analizan mediante SEC.

20 4.5 Experimentos de congelación/descongelación (5 ciclos)

Las muestras se diluyen hasta la concentración de ensayo y se almacenan a 4°C durante al menos 24 horas para llegar al equilibrio.

25 A continuación, después de medir el perfil SEC a $t = 0$, las muestras se almacenan a -20°C durante al menos un día, después se descongelan a +4°C (durante al menos un día), a continuación se congelan/descongelan de nuevo hasta cinco ciclos con el mismo procedimiento.

Al final, después del quinto ciclo de descongelación (y re-equilibrado a 4°C durante al menos 24 horas), las muestras son analizadas mediante SEC.

4.6 Solubilidad

La proteína se almacenó a -80°C en el tampón siguiente (preformulación):

30 Fosfato de Na 50 mM + NaCl 500 mM + glicerol al 10% de pH 7,5

Dicho lote del Compuesto 1 tenía la siguiente concentración: 1,32 mg/ml.

Se realizaron pruebas de estabilidad y F/T en este lote en tampón de almacenamiento.

Ejemplo 5 - Comportamiento biológico de dos proteínas heterodiméricas IFN-β-Fc: Compuesto 1 y Compuesto 2

5.1 Introducción

35 El comportamiento biológico de dos preparaciones de proteínas heterodiméricas IFN-β-Fc, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 en comparación con IFN-β1 humano recombinante (preparación de referencia 3 MUI/ml, 11 µg/mL) se verificó en términos de actividad antiviral (WISH/VSV, Figura 5) y antiproliferativa (células WISH, Figura 6) así como en un análisis del gen informador (células Vero de mono transfectadas con pMX-Luc, Figura 7).

5.2 Métodos

40 5.2.1 Análisis antiviral

Se estudió la actividad antiviral de las proteínas heterodiméricas IFN-β-Fc mediante la medición de la protección ejercida por la molécula de IFN-β sobre células WISH (línea celular de amnion humana), contra el efecto citopático (ECP) del virus de la estomatitis vesicular (VSV; Rubinstein et al 1981).

45 Las células WISH, desarrolladas en MEM + FBS al 10%, se cultivaron en placa en MEM + FBS al 5% a 4×10^4 células en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía las muestras de IFN-beta

(partiendo de una concentración de 0,7 ng/ml), a ocho diluciones seriadas 1:1,5. Las células se incubaron después durante 18-22 horas a 37°C, CO₂ al 5%. Al final del tiempo de incubación, se añadió la suspensión de VSV (en MEM + FBS al 2,5%) y se incubó durante otras 20-25 horas a 37°C, con CO₂ al 5%.

5 Las células se tiñeron con MTT Bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). Y se midió la densidad óptica (DO a 595 nm) en cada pocillo mediante un espectrofotómetro de barrido multipocillo.

10 Las preparaciones de IFN-β-Fc se sometieron a ensayo en paralelo en dos experimentos independientes. Las curvas dosis-respuesta generadas de este modo se interpolaron mediante una curva dosis-respuesta (pendiente variable) sigmoidea (Graph Pad Software). Se informó de las concentraciones (pM) sobre el eje de las x y se informó de los valores de absorbancia relevantes (DO), que se normalizaron contra el virus de control y las células de control (crecimiento 0 y 100%) sobre el eje las y como porcentaje de inhibición del efecto citopático.

5.2.2 Análisis antiproliferativo

15 Las células WISH en MEM + FBS al 5% se cultivaron en placa a 1×10^4 en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía las muestras de IFN-beta (partiendo de una concentración de 40 ng/ml), a nueve diluciones seriadas 1:2, a continuación se incubaron durante 72 horas a 37°C, CO₂ al 5%. Al final del período de incubación, las células se tiñeron con MTT y se midió la densidad óptica (DO a 595 nm) en cada pocillo mediante un espectrofotómetro de barrido multipocillo.

20 Las preparaciones de IFN-β-Fc se sometieron a ensayo en paralelo en dos experimentos independientes. Las curvas dosis-respuesta generadas de este modo se interpolaron mediante una curva dosis-respuesta (pendiente variable) sigmoidea (Graph Pad Software). Se informó de las concentraciones (pM) sobre el eje de las x y se informó de los valores de DO, que se normalizaron contra las células de control (sin IFN-β añadido, 100% de crecimiento), sobre el eje de las y como porcentaje del crecimiento celular.

También se pueden utilizar un sistema de célula/virus diferente (por ejemplo A549/EMCV) y una línea celular diferente (Hs294T) para la medición de las actividades antivirales y antiproliferativas.

5.2.3 Análisis del gen informador

25 El ensayo del gen informador (RGA) se desarrolló como un análisis biológico *in vitro* altamente específico y sensible para el seguimiento de la actividad IFN-β. Se transfectaron establemente células Vero (células de riñón de mono verde Africano de la ATCC, CCL 81), carentes de IFN-α e IFN-β endógenos con el plásmido PMX-Luc que portaba el gen de la Luciferasa (Luc) bajo el control del promotor Mx1 murino inducible por IFN-α/β. Se seleccionó un clon sobre la base de la inducibilidad de Luc por IFN-β (Canosi et al. 1996).

30 El análisis está basado en la medición de la emisión de luz causada por la oxidación de la Luciferasa por Luciferasa.

La cantidad de luciferasa producida por las células Vero de mono transfectadas es una función de la cantidad de IFN-β añadido y se mide automáticamente mediante un luminómetro conectado al soporte lógico.

35 Las células Vero se cultivaron en placa (40.000 células) en cada pocillo de placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían muestras de IFN-β a siete diluciones seriadas 1:2 con una concentración inicial de 234 pg/ml. Después de alrededor de 21 horas de incubación (37°C en CO₂ al 5%), la placa de ensayo se invirtió para eliminar el contenido, la capa de células se lavó una vez con PBS y se añadió a cada pocillo tampón de lisis celular. La placa se dejó durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente y después se introdujo luz Victor 1420, donde se inyectó automáticamente el Reactivo de Ensayo de Luciferasa (LAR) en cada pocillo y la luz emitida, causada por la oxidación de la Luciferasa por Luciferasa, se midió como cuentas por segundo (cps).

40 Las preparaciones de IFN-β-Fc se sometieron a ensayo en paralelo en dos experimentos. Las curvas dosis-respuesta generadas de este modo en cada ensayo fueron interpoladas mediante una curva dosis-respuesta (pendiente variable) sigmoidea (Soporte Lógico Graph Pad), en la que se informó de la actividad de IFN-β, expresada como masa (pg/ml) sobre el eje de las x y se informó de los valores de cps relevantes, que se normalizaron contra el valor basal y el valor máximo (0 y 100%) sobre el eje de las y como porcentaje de cps.

45 Para calcular la concentración de IFN-β real que se iba a añadir a las células, se consideró la contribución de la masa de IFN-β al IFN-β-Fc:

- Compuesto 1: 0,94 mg/ml de IFN-β-Fc = 0,26 mg/ml de IFN-β

- Compuesto 2: 1,10 mg/ml de IFN-β-Fc = 0,31 mg/ml de IFN-β

5.2.4 Resultados y conclusiones

50 Independientemente del sistema celular utilizado, el sIFNbeta-IgGFcmut (Compuesto 1) mostró una actividad biológica comparable a la de una proteína de monómero-dímero que contenía una sola mutación N → A en la

posición 297 de acuerdo con el índice de EU (Compuesto 2; Figuras 5 a 7) y comparable a la preparación de IFN-β humana recombinante.

Ejemplo 6 - Bioanálisis

5 Se calculó el título tanto del Compuesto 1 como del Compuesto 2 sobre una base teórica y se determinó utilizando el método convencional (VSV-WISH), aplicado actualmente a la determinación del título de IFN-β. Los resultados se resumen en la Tabla 2:

Tabla 2

	Actividad Teórica (MUI/mL)	Título (MUI/mL)
Compuesto 1	100	81,8
Compuesto 2	83	62,5

La actividad teórica se basa en la siguiente consideración:

10 Para IFN-β (22kD), el factor de conversión de MUI en [μg] es 3,66. Así, 1 MUI corresponde a 3,66 μg.

Para IFN-β-Fc (77 kD), si suponemos que la actividad específica de la masa es lineal, el factor se multiplica por 3,5 y termina siendo 12,8. Así, 1 MUI corresponde a 12,8 μg.

Ejemplo 7 – Análisis de unión del receptor de Fc/complemento

7.1 Introducción

15 Debido a que contienen porciones Fc de anticuerpos, las proteínas de fusión IFN-beta tienen el potencial de provocar funciones efectoras asociadas con anticuerpos: citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

20 En la ADCC los anticuerpos específicos de los antígenos (IgG, por ejemplo) dirigen las células inmunológicas efectoras del sistema inmunitario innato que expresan los receptores de Fc gamma (FcγR) para destruir las células que expresan el antígeno. Los FcγR se expresan sobre las células NK, neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células B y comprenden tres clases: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). En seres humanos, las dos últimas clases se dividen adicionalmente en FcγRIIIa y FcγRIIIb, FcγRIIIa y FcγRIIIb. Estos receptores difieren en su afinidad por las diferentes subclases de IgG y se pueden dividir en receptores de afinidad alta, intermedia o baja. El receptor de alta afinidad (CD64) se une a IgG monomérica y se encuentra normalmente ocupado por IgG en suero. Los receptores de afinidad intermedia y baja (CD16 y CD32, respectivamente) se unen a IgG agregada y a complejos inmunitarios que contienen IgG. Se cree que las células NK son los principales actores en la ADCC, a pesar de que los monocitos-macrófagos y neutrófilos pueden también desempeñar un papel, y CD16 expresado por las células NK es considerado como el "receptor de ADCC". Las células NK destruyen sus células diana a través de la liberación de gránulos citotóxicos (perforina, granulinsina y granzima).

30 La activación del complemento a través de la llamada "vía clásica" se produce tras la unión de C1q al dominio Fc de las inmunoglobulinas, IgG o IgM, complejoado con antígenos. C1q es una gran glicoproteína compleja de ~410 kDa presente en el suero humano a una concentración de alrededor de 70 μg/ml.

35 Junto con dos serina proteasas, C1r y C1s, C1q forma el complejo C1, el primer componente del complemento. La capacidad de las cuatro subclases de IgG humanas (en forma monomérica) para unirse a C1q disminuye en el siguiente orden: IgG3>IgG1>IgG2>IgG4 (IgG4 no activa el complemento). La flexibilidad de Fab-Fab y Fab-Fc dependiente de la bisagra determina la accesibilidad del sitio de unión del complemento a C1q, por tanto IgG3, la subclase de IgG humana con la bisagra más larga, es la subclase más eficaz en la activación del complemento. La incapacidad de IgG4 para activar el complemento es debida a la estructura del fragmento Fc, así como al impedimento estérico de los sitios de unión al complemento por los brazos Fab.

40 El Compuesto 1 contiene las modificaciones que reducen las "funciones efectoras", es decir, la unión a los receptores Fcγ y a C1q (Figuras 1 y 2). Para demostrar formalmente la eficacia de estas mutaciones, se llevó a cabo un estudio para comparar la capacidad del Compuesto 1 y el Compuesto 2 para unirse a uno de los receptores Fcγ, FcγRI (CD64) y a C1q. Se emplearon métodos de citometría de flujo basados en células y ELISA de unión.

7.2 Resultados

45 El Compuesto 1 y el Compuesto 2 mostraron reducción de la unión a CD64 (FcγRI), en comparación con IgG1 humana.

Tanto IgG4 como IgG1 se unieron a CD64 expresado en la superficie de las células AII1.6 transfectadas, de una manera dependiente de la dosis, mostrando IgG4 una unión ligeramente menor que IgG1. Por el contrario, el Compuesto 2 mostró sustancialmente menos unión que IgG1 humana y el Compuesto 1 mostró incluso una reducción adicional de la unión, comparable a la obtenida con un control negativo (Figura 8). Ninguna de las moléculas se unen a las células IIA1.6 no transfectadas.

Para caracterizar la unión de C1q al Compuesto 1 y al Compuesto 2 se llevó a cabo un ensayo de unión ELISA-C1q. Los resultados se presentan en la Figura 9 (Fig. 9a y Fig. 9b). La IgG1 presentó una alta actividad de unión a C1q mientras que no se detectó unión para el Compuesto 1, o los controles negativos (NEG e IgG4). El Compuesto 2 presentó una unión muy ligera. Las IgG2 no se unieron a C1q bajo estas condiciones experimentales.

Para investigar adicionalmente la capacidad de unión a C1q del Compuesto 1 y el Compuesto 2, se utilizó un sensor de resonancia de plasmón superficial para medir la afinidad de estas moléculas por C1q. IgG1 sirvió como control positivo, mientras que IgG4 se incluyó como control negativo.

Las moléculas de IFN- β -Fc, junto con los controles se inmovilizaron individualmente en un chip CM5 entrecruzando residuos de aminos primarias con la superficie de dextrano. Se verificaron la asociación y la disociación en tiempo real de C1q con las proteínas inmovilizadas en un biosensor Biacore 3000. La unión de C1q a IgG1 se caracterizó por un fuerte aumento de la respuesta durante la fase de asociación del sensograma y una disminución lenta de la fase de disociación. El Compuesto 2 mostró muy poca unión a C1q, mientras que el Compuesto 1 no mostró unión.

De este modo, las mutaciones contenidas en el Compuesto 1 impiden completamente la unión del Compuesto 1 a C1q (Figura 9). Los estudios descritos anteriormente demuestran que las mutaciones introducidas en la porción Fc de Compuesto 1 no sólo reducen eficazmente la unión de esta molécula a células transfectadas con CD64 (Fc γ RI), sino que también suprimen la unión del Compuesto 1 a C1q en contraste con el Compuesto 2. Se obtuvieron resultados similares con células monocíticas humanas U937 no transfectadas que expresan CD64 endógeno. En el caso de las células transfectadas con CD64, la unión fue idéntica a la obtenida con un control negativo.

En resumen, los datos obtenidos demuestran que el Compuesto 1 no se une a C1q bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio, mientras que el Compuesto 2 conserva una baja unión.

Ejemplo 8 - Estudio PK/PD en monos

Se realizó un estudio farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) en monos, la única especie animal casi igualmente sensible a IFN- β humano.

Tanto el Compuesto 1 como el Compuesto 2 se analizaron en muestras de suero utilizando un inmunoensayo enzimático para el análisis de los niveles en suero de IFN-beta en monos (FujiRebio, modificado y validado en el suero mono para el análisis de IFN- β).

El Compuesto 1 y el Compuesto 2, en lugar del patrón IFN- β , se utilizaron para la construcción de las curvas de calibración.

8.1 Introducción

El Compuesto 1 contiene varias mutaciones dirigidas a reducir la unión a los receptores Fc γ y a C1q. Para comprobar si estas mutaciones alteraron las propiedades PK/PD del Compuesto 1, se realizó un estudio *in vivo* en monos, la única especie animal sensible a IFN- β . El estudio consistió en 3 grupos de 5 monos *Cynomolgus* cada uno. El primer grupo recibió Rebif[®], mediante administración subcutánea, a la dosis de 55 pmol/kg, como referencia. El 2^º grupo de monos recibió el Compuesto 2, mientras que el 3^{er} grupo de monos recibió el Compuesto 1, ambos por inhalación a la dosis deseada depositada en los pulmones de 138 pmol/kg. Se midieron el IFN- β , el Compuesto 1 y el Compuesto 2, así como los niveles en suero de Neopterinina. Los análisis de PK y PD se realizaron después de la resta de cualquier concentración existente antes de la dosificación, de acuerdo con un análisis no compartimental.

8.2 Resultados Farmacocinéticos

El perfil en suero medio (DT) de los niveles en suero de IFN después de la administración de Rebif[®] por vía subcutánea a la dosis de 55 pmol/kg, de los niveles en suero del Compuesto 1 después de la administración del compuesto 1 mediante inhalación a la dosis consignada nominal de 138 pmol/kg, y de los niveles en suero del Compuesto 2 después de administraciones del Compuesto 2 mediante inhalación a la dosis consignada nominal de 138 pmol/kg, se muestra en la Figura 10. Después de la administración del Compuesto 1 o del Compuesto 2 mediante inhalación, a la dosis consignada (en los pulmones) de 138 pmoles/kg, las C_{max} medias fueron 22,51 + 7,43 pmol/L (Compuesto 2) y 16,36 + 6,94 pmol/L (Compuesto 1) en un tiempo medio de 8 horas, en comparación con la C_{max} media de Rebif de 1,40 ± 1,10 pmol/L, alcanzada en el t_{máx} medio de 3 horas. El AUC_{last} (Aérea Bajo la Curva hasta la última concentración cuantificable) fue 886 + 393 h.pmol/L para el Compuesto 2 y 505 + 322 h.pmol/L para el Compuesto 1, que en comparación con Rebif significa una AUC_{last} media de 12,5 + 20,0 h.pmol/L.

La vida media de eliminación aparente fue de $27 \pm 4,5$ h para el Compuesto 2 y de $24,1 \pm 8,4$ h para el Compuesto 1. Tanto el Compuesto 1 como el Compuesto 2 mostraron niveles séricos regulares y consistentes, mucho mayores que los observados con IFN- β . De hecho ambos mostraron una exposición cumulativa mucho mayor que la observada con Rebif[®] inyectado.

- 5 El perfil en suero medio (DT) de los niveles en suero de Neopterina corregidos en el período inicial se calcularon después de administraciones de Rebif[®] por vía subcutánea a la dosis de 55 pmol/kg, del Compuesto 1 mediante inhalación a la dosis consignada nominal de 138 pmol/kg, y del Compuesto 2 mediante inhalación a la dosis consignada nominal de 138 pmol/kg. Los parámetros farmacodinámicos principales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Principales parámetros farmacodinámicos

	Rebif	Compuesto 2	Compuesto 1
Emax (ng/ml)	3,87 (2,41)	3,59 (1,03)	2,86 (1,91)
AUClast (h.ng/mL)	407 (270)	552 (167)	375 (252)

10

El nivel de predosificación de Neopterina de los animales osciló entre 1,11 y 5,06 ng/mL, frente a un valor por lo general de alrededor de 1 ng/mL. Este hecho debería tenerse en cuenta ya que los mayores niveles de predosificación pueden reducir la posibilidad de observar un aumento adicional de neopterina. Tras la administración subcutánea de Rebif[®], se observó un aumento de neopterina, como era de esperar, en 4 de los 5 monos. Un mono no mostró aumento de neopterina. Este mono tenía el nivel de predosificación más alto de neopterina (4,4 ng/mL) e IFN- β no medible. La combinación de estos dos factores (neopterina alta y posiblemente una dosis administrada menor) puede explicar la falta de respuesta. Esto se sustenta en la consideración de que otro mono tuvo una respuesta clara a la Neopterina, a pesar del hecho de que sólo una muestra de suero mostró niveles de IFN-beta medibles. Para este mono la concentración de predosificación fue de 2,0 ng/ml. Después de la administración del compuesto 1 o del Compuesto 2 por inhalación, a la dosis consignada (en los pulmones) de 138 pmol/kg, la mayoría de los animales mostraron un pequeño aumento de los niveles de Neopterina. Este pequeño aumento es más evidente en algunos animales, mientras que otros, a pesar del claro perfil PK de IFN- β -Fc, tenían solo unas pocas muestras de suero que superaban la concentración basal. En general, tanto el Compuesto 1 como el Compuesto 2 mostraron un comportamiento de PK y PD similar.

15

20

- 25 La siguiente Tabla 4 aclarará la identidad de las secuencias referidas en la Lista de Secuencias y en todo el texto:

Tabla 4

SEQ ID NO:	Descripción de la secuencia
1	Región constante pesada de IgG1 humana
2	Fragmento de la región bisagra de IgG1 humana
3	Brazo Fcmut (es decir, un brazo Fc de IgG mutado no ligado a la proteína IFN-beta)
4	Secuencia que codifica el brazo Fcmut
5	Brazo Fc mut con el péptido señal de la cadena ligera de IgK de ratón
6	Secuencia que codifica el brazo Fcmut con el péptido señal de la cadena ligera de IgK de ratón
7	IFN-beta maduro humano
8	Brazo IFNbeta-Fcmut (es decir un brazo Fc de IgG mutado ligado a una proteína IFN-beta sencilla)
9	Secuencia que codifica el brazo IFNbeta-Fcmut
10	Brazo IFNbeta-Fcmut con el péptido señal de IFN-beta humano
11	Secuencia que codifica el brazo IFNbeta-Fcmut con el péptido señal de IFN-beta humano
12	Vector C370

13	Conector de 8 aminoácidos
14	Subunidad del Compuesto 2 no ligada a IFN-beta
15	Subunidad del Compuesto 2 ligada a IFN-beta a través de un conector de 8 aa

Lista de referencias

1. Canosi U., M. Mascia, L. Gazza, O. Serlupi-Crescenzi, S. Donini, F. Antonetti, G. Galli, *J. Immunol. Methods*, 199, 69-76 (1996).
- 5 2. Kabat, EA, Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., y Foeller, C. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD.
3. Rubinstein, S., Familletti, C P., y Pestka, Convenient Assay for Interferons. *J. Virol* 1981, 37, 755-758.
4. Spiekermann GM, Finn PW, Ward ES, Dumont J., Dickinson BL, Blumberg RS, Lencer WI. Receptor mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung . *J Exp Med* 2002, 5 de Agosto, 196 (3):303-10.
- 10 5. Documento WO 2005/001025
6. Documento US 6.485.726

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Laboratorios Serono SA

5 <120> Interferón beta sencillo fusionado a un fragmento Fc de IgG mutado

<130> 1162 WO/PCT

10 <150> EP 07118980.7
<151> 2007-10-22

<150> US 61/007.142
<151> 2007-12-11

15 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens

25 <220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(98)
<223> Dominio CH1

30 <220>
<221> RASGO_MISC
<222> (99)..(110)
<223> Región bisagra

35 <220>
<221> DOMINIO
<222> (111)..(223)
<223> Dominio CH2

40 <220>
<221> DOMINIO
<222> (224)..(330)
<223> Dominio CH3

<400>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de la región bisagra

10 <400> 2

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 1 5

<210> 3
 <211> 227
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Brazo Fcmut

20 <400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly
 1 5 10 15

Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 4
 <211> 681
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Brazo Fcmut

10 <400> 4

gacaaaactc acacatgccc accgtgceca gcacctgaag ccgagggggc accgtcagtc 60

ttctcttccc ccccaaaacc caaggacccc ctcatgatct cccggacecc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggcca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac 240

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccctcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 420

aaccaggtea gcctgacctg cctgggtcaa ggcttetatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggtctct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctctccctgt ctccgggtaa a

681

5 <210> 5
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Brazo Fcmut con péptido señal de cadena ligera de IgK de ratón

15 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(20)
 <223> Péptido señal de cadena ligera de IgK de ratón

20 <220>
 <221> péptido_mat
 <222> (21)..(247)
 <223> Brazo Fcmut

<400> 5

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 -20 -15 -10 -5

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 -1 1 5 10

Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 15 20 25

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 30 35 40

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 45 50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 65 70 75

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 80 85 90

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 95 100 105

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 110 115 120

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 125 130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 160 165 170

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 175 180 185

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 190 195 200

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 205 210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225

- <210> 6
- <211> 741
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial

- <220>
- <223> Brazo Fcmut con péptido señal de cadena ligera de IgK de ratón

- 10 <220>
- <221> péptido_señ
- <222> (1)..(60)
- <223> Péptido señal de cadena ligera de IgK de ratón

- 15 <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (61)..(741)
- <223> Brazo Fcmut

- 20 <400> 6
- atggagacag acacactcct gctatgggta ctgetgctct gggttccagg ttccactggt 60
- gacaaaactc acacatgccc acogtgccc gcacctgaag ccgagggggc accgtcagtc 120
- ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 180
- tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 240
- ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtataa cagcacgtac 300
- cgtgtggtca gcgtctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 360
- tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccatcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 420

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 480
aaccaggtea gcttgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 540
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccogt gctggactcc 600
gaeggctect tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 660
aacgtcttet catgctcogt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 720
ctctccctgt ctccgggtaa a 741

<210> 7
<211> 7166
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

5 <210> 8
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Brazo IFN-beta-Fcmut

10 <220>
 <221> péptido_mat
 <222> (1)..(166)
 <223> IFN-beta humano maduro

15 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (167)..(393)
 <223> Brazo Fcmut

20 <400> 8

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 165 170 175

Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 180 185 190

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 195 200 205

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 210 215 220

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 245 250 255

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 260 265 270

Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 275 280 285

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 290 295 300

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 305 310 315 320

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 325 330 335

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 340 345 350

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 355 360 365

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 370 375 380

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

385

390

- 5 <210> 9
- <211> 1179
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Brazo IFN-beta-Fcmut

- <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (1)..(498)
- <223> IFN-beta humano maduro

- 15 <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (499)..(1179)
- <223> Brazo Fcmut

- 20 <400> 9

```

atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttcagtg tcagaagctc      60
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgccctcaagg acaggatgaa ctttgacatc      120
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt gaccatctat      180
gagatgctcc agaacatott tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat      240
gagactattg ttgagaacct cctggctaata gtctatcacc agataaacca tctgaagaca      300
gtcctggaag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat gagcagctctg      360
cacctgaaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga agccaagga gtacagtcac      420
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact ttacttcat taacagactt      480
acaggttacc tccgaaacga caaaactcac acatgccacc cgtgccaccg acctgaagcc      540
gagggggcac cgtcagtttt cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc      600
cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag      660
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc aagacaaagcc gggggaggag      720
cagtacaaca gcscgtaccg tgtggtcagc gtccctaccg tctgcacca ggactggctg      780
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc acaaaagccc tccatcctc catcgagaaa      840
accatctcca aagccaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc      900
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg ctctatccc      960
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag      1020
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag      1080
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac      1140

```

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa

<210> 10
 <211> 414
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> Brazo IFN-beta-Fcmut con péptido señal de IFN-beta humano

 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(21)
 <223> péptido señal de IFN-beta humano
 15
 <220>
 <221> péptido_mat
 <222> (22)..(187)
 <223> IFN-beta humano maduro
 20
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (188)..(414)
 <223> Brazo Fcmut
 25
 <400> 10
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Cys Phe Ser
 -20 -15 -10

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 -5 -1 1 5 10

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 15 20 25

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 30 35 40

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 45 50 55

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 60 65 70 75

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 80 85 90

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 95 100 105

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 110 115 120

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 125 130 135

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 140 145 150 155

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Asp Lys Thr His Thr
 160 165 170

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe
 175 180 185

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 190 195 200

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 205 210 215

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 220 225 230 235

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 240 245 250

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 255 260 265

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 270 275 280

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 285 290 295

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 300 305 310 315

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 320 325 330

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 335 340 345

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

350

355

360

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 365 370 375

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 380 385 390

5 <210> 11
 <211> 1242
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Brazo IFN-beta-Fcmut con péptido señal de IFN-beta humano

15 <220>
 <221> péptido_señ
 <222> (1)..(63)
 <223> Péptido señal de IFN-beta humano

20 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (64)..(561)
 <223> IFN-beta humano maduro

25 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (562)..(1242)
 <223> Brazo Fcmut

<400> 11
 atgaccaaca agtgtctct ccaaattgct ctctgttgt gttctccac tacagctett 60
 tccatgagct acaacttgc tggattocta caagaagca gcaattttca gtgtcagaag 120
 ctctgtggc aatigaatgg gaggcttga tattgctca aggacaggat gaactttgac 180
 atccctgagg agattaagca gctgcagcag tccagaagg aggacgccgc attgaccatc 240
 tatgagatgc tccagaacat ctttgcatt ttcagacaag atccatctag cactggctgg 300
 aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag 360
 acagtccctgg aagaaaaact ggagaaagaa gatttcacca ggggaaaact catgagcagt 420
 ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt 480
 cactgtgctt ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga 540
 ettacaggtt acctccgaaa cgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 600
 gccgaggggg caecgtcagt ettcctcttc ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 660
 tcccggacct ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga cctgaggtc 720
 aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 780

gagcagtaca acagcacgta cegtgtggtc agcgtcctca cegtctgca ccaggactgg 840
 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag cctceccatc ctccatcgag 900
 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 960
 tccggggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcttggtaa aggtttctat 1020
 cccagcgaca tgcctgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1080
 acgectcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctctc acagcaagct caccgtggac 1140
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctcgy tgatgatga ggctctgcac 1200
 aaccactaca cgcagaagag cctctcctg tctccgggta aa 1242

5 <210> 12
 <211> 11014
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Vector C370

15 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (2499)..(3182)
 <223> Brazo Fcmut (hebra complementaria inversa)

20 <220>
 <221> péptido_señ
 <222> (3183)..(3242)
 <223> Péptido señal de la cadena ligera de IgK de ratón (hebra complementaria inversa)

25 <220>
 <221> péptido_señ
 <222> (6548)..(6610)
 <223> Péptido señal de IFN-beta humano

30 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (6611)..(7108)
 <223> IFN-beta humano maduro

35 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (7109)..(7789)
 <223> Brazo Fcmut

<400> 12
 ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa attcgcgta aatttttggt aatcagctc 60
 attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
 gataggggtg agtgtgttc cagtttgaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180
 caacgtcaaa gggcgaaaaa cegtctatca gggcgatggc ccactaogtg aaccatcacc 240

ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag 300
 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa 360
 agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420
 cacacccgcc gcgcttaatg egcegetaca gggcgctgcc cattegccat tcaggctgcg 480
 caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
 gggatgtgct gcaaggggat taagttgggt aacgccaggg tttcccagt cagcagcttg 600
 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccta 660
 gttttttccc cgtatcccc aggtgtctgc aggetcaaag acagcgagaa gcgttcagag 720
 gaaagcgatc ccgtgccacc ttccccgtgc ccgggctgtc cccgcacget gcggetcgg 780
 ggatgcgggg ggagcgccgg accggagcag agtctagttt tttcccgta tccccaggt 840
 gtctgcaggc tcaaagacag cgagaagcgt tcagagaaa gcgatcccgt gccaccttcc 900
 ccgtgcccg gctgtcccc cacgctgccg gctcggggat gcggggggag cgcgggaccg 960
 gagcagagtc taggtaccgg gccccccctc gaggtcgacg gtatcgattt taccacattt 1020
 gtagaggttt tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc cctgaacct gaacatata 1080
 atgaatgcaa ttgttgttgt taacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc 1140
 aatagcatca caaattcac aaataaagca ttttttcac tgcattctag ttgtggtttg 1200
 tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tggatcgaag ctagctttgc ggccgctcag 1260
 gcaccgggct tgcgggtcat gcaccagggtg cgcggtcctt cgggcacetc gacgtcggcg 1320
 gtgacgggtg agccgagccg ctctagaag gggaggttc ggggcgcgga ggtctccagg 1380
 aaggcgggca ccccggcgcg ctccggccgc tccaactcgg ggagcacgac ggcgctgcc 1440
 agacccttgc cctggtggtc gggcgagacg ccgacggtgy ccaggaacca cgcgggctcc 1500
 ttgwgccggt gggcgccag gaggccttc atctgttctc gcgcgccag ccgggaaccg 1560
 ctcaactcgg ccattgcgcg gccgatctcg gcgaacaccg cccccgctt cgcgctctcc 1620
 ggctggtcc agaccgccac cgcggcgccg tcgtccgca cccacacctt gccgatgtcg 1680
 agcccagcgc gcgtgaggaa gagttcttgc agcteggtga cccgctcgat gtggcggtcc 1740
 gggctgacgg tgtggcgcgt ggcggggtag tcggcgaacg cggcggcgag ggtgcgtacg 1800
 gcccggggga cgtcgtcgcg ggtggcgagg cgcaccgtgy gcttgtactc ggtcatggtg 1860
 cggccgcaat ccaattcgtt ttatgataac aatctgtgat tgtcaccata agcagccaca 1920
 ataaaataaa aggaacacg gacaaccaaa gtagtcgggt ccgccacgga cttgcgcggt 1980
 acgacaggcc aatcactggt ttgtgaccac ctgctccgag gttgggatta gccgcattca 2040

ggggcccggag gattcttatg tagctcaata ggctcttcac accttggtca caactagcgt 2100
 cccatggcgt tagccatagg taggcccga acgcagcctg gaccaccgtc accggtgagg 2160
 gatgtccaga ctcatcagcc taagctacac tctggggttg agtgctgagc gcaacgcatt 2220
 gaagattccg aggtgggtact gggcttctcg aagtacataa ggggataacg gatccgtcgc 2280
 tttcaaccac gcaagcagtc tatacgacat caccggggaa acagaagtgc ttgttcgtgg 2340
 tggtagctgt ttgtaccccc ttctattgaa ctgtggtttg tgctgctaag ttacgggaag 2400
 ggagtataaa acaggcgtac aagggtaccg caataccgga gtactagccg ccacgtgggc 2460
 ctctgggggtg ggtacaaccc cagagctggt tctctagatc atttaccggg agacagggag 2520
 aggtctctct gcgtgtagtg gttgtgcaga gcctcatgca tcacggagca tgagaagacg 2580
 ttcccctgct gccacctget cttgtccacg gtgagcttgc tgtagaggaa gaaggagccg 2640
 tcggagtcca gcacgggagg cgtggtcttg tagttgttct ccggtgccc attgctctcc 2700
 cactccacgg cgatgtcgtt gggatagaag cctttgacca ggcaggtcag gctgacctgg 2760
 ttcttggtca tctctcccg ggatgggggc aggtgtaca cctgtggttc tcggggctgc 2820
 cctttggctt tggagatggt tttctgatg gaggatggga gggctttgtt ggagacctg 2880
 cacttgtact ccttgccatt cagccagtc tggtaggga cggtaggac gotgaccaca 2940
 cggtagctgc tgttgtagct ctctcccgc ggcctttgtct tggcattatg cactccacg 3000
 ccgtccacgt accagttgaa cttgacctca ggtctctcgt ggctcacgtc caccaccag 3060
 catgtgacct caggggtccg ggagatcatg aggtgtcct tgggttttgg ggggaagagg 3120
 aagactgacg gtgccccctc ggttcaggt gctgggcacg gtgggcattg gtgagttttg 3180
 tcaccagtgg aacctggaac ccagagcagc agtaccata gcaggagtgt gtctgtctcc 3240
 atggcgcgcc gtttaaacac gcgtactaga gaattgatcc cgtgtcaagg acggtgactg 3300
 cagaaaagac coatggaaag gaacagtctg ttagtctgtc agctattatg tctggtggcg 3360
 cgcgcggcag caacgagtag tctcagact acactgcoct ccaccgttaa cagcaccgca 3420
 acgggagtta cctctgactc ttatcagaac acaacaactc agctgectgc atcttctct 3480
 gccgtgctt taagtcttcc aaatgcgta cgggtgcaag cccgctcccc gagctcattt 3540
 tcagacacat acctaccgc cagggccttg tgcggcacac tgggtggtggg gggcatcgtg 3600
 ctgtgcctaa gtctggcctc cactgttagg agcaaggagc tgccgagcga ccatgagtcg 3660
 ctggaggcat gggagcaggg ctggatgta gaagctccgc cgctaccgga gaagagccca 3720
 tgtccggaac acgtaccgga gattcgcgtg gagatccac gttatgttta ataaaaactg 3780
 cgggcactgg ggacggtggt gttgtatag tgaatttgta aataataaat gagaccccat 3840
 cctgtaaaaa tacagagtcc gtgtcagctc ctgaaggaca gtgtattggc atatagccaa 3900

taaagagagt tgtggcaag agccatgta tggattagta atggaaagta tcgtcaccaa 3960
 taggggagtg gtcaataatg gtcaantaacc cacacetata ggctaageta taccatcacc 4020
 tataacatga ggaagogggg gtglatagac cccaagccaa aaacagtata gcatgcataa 4080
 gaagccaagg ggggtgggct atagacteta taggcggtae ttacgtcaet cttggcacgg 4140
 ggaatccgcg ttccaatgca cegtteccgg cegggctgca ggctaggcga ggagctctgc 4200
 gttctacggg ggtcagaccg aagactgca cggtagccgac gctggctcgg cctcttatac 4260
 ccacgtagaa cgcagctcag ccaatagaat gcgtgccaat atggaatttc caggggaaaa 4320
 ccggggcggt gttacgtttt ggctgccctt tcaattccca ttgacgtgta ttggctcgag 4380
 aacggtactt tcccattaat cagctatggg aaagtaccgt ttaaaggta cgttgatta 4440
 gtttcaatag cccattgacg tcaatgggga gaaagtacat ggcgttttaa ttaaattggc 4500
 tggaaaaacc caatgactca ccctattga ccttatgtac gtgccaataa tgggaaaaac 4560
 ccattgactc accccctatt gacctttgt actgggcaaa acccaatgga aagtccctat 4620
 tgactcagtg tacttggtc caatgggact ttctgttga ttcaccceta ttgacctat 4680
 gtactgggca aaaccattg gaaagtcct aatgactcag tatacgtgcc agtaatggga 4740
 aaaaccatt ggcttacctc ccattgacct tatgtattgg gcaaaacca ttggaaagtc 4800
 cctattgact caatgtactt ggctccaatg gaacttctct gttgactcac cccctattga 4860
 ccctatgtac tgggcaaac ccaatgaaa gtcctattg agtcagtga cttggctcca 4920
 atgggttttt cccattgact catcccctat tgacctatg tactgggcaa aaccattgg 4980
 aaagtcctta ttgacgcagt gtacttggt ccaatgggac tttctgttg attcaccccc 5040
 tattgacctt atgtactggg cagaatacaa tggaaagtcc ctattgactc acccacattg 5100
 accttatatg cttgccaaca atggaaaaac ccattggaaa gtccctattg agtcagtga 5160
 cttggcaga atgggttttt cccattggct cacctcccat tgaccaatg tacttgggca 5220
 aaaccagtg gaaagtccca tttgactcag tgtgcttggc agtaatggga aaaaccatt 5280
 ggcttacctc ccattgacct aatgtacttg ggtaaaggcc attgagtcac caccctatg 5340
 ctgggaaatg gtgaacgccc cctatgtgga aagtcctat gggccgcat tagagtgcac 5400
 gaccgtgctg attcatatgc catatgagtg tattaggggg ctttccgctt gggaaattgg 5460
 gtaaaaagtc ccgtattac tcacataggg ggcgtttggc tttgcaaatt aggggatttc 5520
 agtgcatttg gcttaaaaa ctattggttc tagtcataaa acgggcggag ttaaccatat 5580
 aaaagctgtc cccatgcca ttcgagccca gagccggggc cgggaacggg gcattggaac 5640
 gcggattccc cgtgccaaaga gtgacgtaag taccgctat agagtctata ggcccccccc 5700

cttggettot tatgeatget atactgtttt tggcttgggg tctatacacc cccgcttctt 5760
 catgttatag gtgatggtat agcttagcct ataggtgtgg gttattgacc attattgacc 5820
 actceectat tggtgacgat actttccatt actaatccat aacatggctc tttgccacaa 5880
 ctctctttat tggctatatg ccaatacact gtccttcaga gactgacacg gactctgtat 5940
 ttttacagga tggggtctca tttattattt acaaattcac atatacaaca ccaccgtccc 6000
 cagtgcccgc agtttttatt aaacataacg tgggatctcc acgcgaatct cgggtacgtg 6060
 ttccggacat gggctcttct ccggtagcgg cggagcttct acatccgagc cctgctccca 6120
 tgccctcagc gactcatggt cgctcggcag ctctctgtct ctaacagtgg aggccagact 6180
 taggcacagc acgatgccca ccaccaccag tgtgccgcac aaggccgtgg cggtagggtt 6240
 tgtgtctgaa aatgagctcg gggagcgggc ttgcaccgct gacgcatttg gaagacttaa 6300
 ggcagcggca gaagaagatg caggcagctg agttgttgtg ttctgataag agtcagaggt 6360
 aactcccgtt gcggtgctgt taacgggtgga gggcagtgtg gtctgagcag taactcgttgc 6420
 tgccgcgcgc gccaccagac ataatagctg acagactaac agactgttcc tttecatggg 6480
 tcttttctgc agtcaccgtc cttgacacgg gatcaattct ctagtacgeg tgtttaaacg 6540
 gcgcgccatg accaacaagt gtctctcca aattgctctc ctggttggct tctccactac 6600
 agctctttcc atgagctaca acttgcttgg attctacaa agaagcagca attttcagtg 6660
 tcagaagctc ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgccctcaagg acaggatgaa 6720
 ctttgacatc cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt 6780
 gacctctat gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac 6840
 tggctggaat gagactattg ttgagaacct cctggctaat gtctatcctc agataacca 6900
 tctgaagaca gtccctggaag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat 6960
 gagcagctcg cacctgaaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaagga 7020
 gtcagtcac tgtgcttggc ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact ttacttcat 7080
 taacagactt acaggttacc tccgaaacga caaaactcac acatgccac cgtgccacg 7140
 acctgaagcc gagggggcac cgctcagctt cctcttccc ccaaaacca aggacacct 7200
 catgatctcc cggaccctcg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc 7260
 tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc 7320
 gggggaggag cagtacaaca gcaegtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca 7380
 ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc tccatctct 7440
 catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct 7500
 gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg 7560

cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta 7620
 caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac 7680
 cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc 7740
 tctgcacaac cactacaagc agaagagcct ctccctgtct cccggtaaat gaggcgcgcc 7800
 tctagagggg tggcatccct gtgacccctc cccagtgcct ctccctggccc tggaaagtgc 7860
 cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaataaaaattaagt tgcattcattt tgtctgacta 7920
 ggtgtccttc tataatatta tggggtggag gggggtggta tggagcaagg ggcaagttgg 7980
 gaagacaacc tgtagggcct gccgggtcta ttcgggaacc aagctggagt gcagtggcac 8040
 aatcttggct cactgcaatc tccgcctcct gggttcaagc gattctcctg cctcagcctc 8100
 ccgagttggt gggattccag gcatgcatga ccaggctcag ctaatttttg tttttttggt 8160
 agagacgggg tttcaccata ttggccaggc tggctccaa ctccataatct caggtgatct 8220
 acccacttg gccccc aaa ttgctgggat tacaggcgtg aaccactgct ccttccctg 8280
 tccttctgat tttaaaataa ctataccagc aggaggacgt ccagacacag cataggctac 8340
 ctgccatgcc caaccggtgg gacatttgag ttgcttgctt ggcactgtcc tctcatgcgt 8400
 tgggtccact cagtagatgc ctggtgaatt caagcttgat atcgaattcc tgcagccggg 8460
 gggatccact agttttttcc ccgtatcccc caggtgtctg caggctcaaa gacagcgaga 8520
 agcgttcaga gaaagcgat ccctgcccac cttcccctg cccgggctgt ccccgcacgc 8580
 tgccggctcg gggatgcggg gggagcgcgg gaccggagca gactctagtt tttcccctg 8640
 atccccagg tgtctgcagg ctcaaagaca gcgagaagcg ttcagaggaa agcgatcccg 8700
 tgcacette ccctgcccg ggctgtcccc gcacgctgcc ggctcgggga tgcgggggga 8760
 gcgcccgaac ggagcagagt ctagctagag cggccgccac cgcggtggag ctccagcttt 8820
 tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc ttgggtaat catggtcata gctgttctct 8880
 gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt 8940
 aaagcctggg gtgcctaag agtgagctaa ctacattaa ttgcgttgcg ctactgccc 9000
 gctttccagt cgggaaacct gtcgtgocag ctgcattaat gaatcgcca acgcggggg 9060
 agagggcgtt tgcgtattgg gcctcttcc gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg 9120
 gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca 9180
 gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa gcccaggaac 9240
 cgtaaaaagg ccgcgttgcg ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 9300
 aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagc gactataaag ataccagggc 9360

tttccccctg gaagetccct cgtgegetct cctggtccga ccctgcccct taccggatac 9420
 ctgtcccgct ttctcccttc ggggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat 9480
 ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcaogaacc ccccgttcag 9540
 cccgaccgct gcgccttata cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac 9600
 ttategccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggc 9660
 gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatattggc 9720
 atctgcgctc tgcctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 9780
 aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttga agcagcagat tacgcgcaga 9840
 aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 9900
 gaaaactcac gttaagggat tttggctatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 9960
 cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctc 10020
 gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca 10080
 tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct 10140
 ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca 10200
 ataaaccagc cagccggaag ggcgcgagcc agaagtggc ctgcaacttt atccgcctcc 10260
 atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcggcagc taatagttg 10320
 cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcacc gtgggtgcac gctcgtcgtt tggatatggt 10380
 tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa 10440
 aaagcggtta gctccttcgg tctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta 10500
 tcactcatgg ttatggcagc actgcataat tctctactg tcatgccatc cgtaaagatc 10560
 tttctctga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gccggcagccg 10620
 agttgctctt gcccgccgct aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa 10680
 gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg 10740
 agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc 10800
 accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggataaagg 10860
 gcgacacgga aatggtgaat actcactacc ttcctttttc aatattattg aagcatttat 10920
 cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taascaata 10980
 ggggttcgc gcacatttc ccgaaaagtg ccac 11014

- <210> 13
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector

<400> 13
Glu Phe Ala Gly Ala Ala Ala Val

5

1 5

<210> 14
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Subunidad del Compuesto 2 sin IFN-beta

10

15

<400> 14
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165

170

175

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

- <210> 15
- <211> 401
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Subunidad del Compuesto 2 con IFN-beta
- 10 <220>
- <221> péptido_mat
- <222> (1)..(166)
- <223> IFN-beta humano maduro
- 15 <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (167)..(174)
- <223> Conector
- 20 <220>
- <221> DOMINIO
- <222> (175)..(401)
- <223> Porción Fc
- 25 <400> 15

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Glu Phe Ala Gly Ala Ala Ala Val Asp Lys
165 170 175

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
180 185 190

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
195 200 205

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
210 215 220

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
225 230 235 240

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val
245 250 255

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
260 265 270

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
275 280 285

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

305					310						315					320
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
				325					330					335		
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
			340					345					350			
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
		355					360					365				
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
	370					375					380					
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
385					390					395					400	
Lys																

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína que comprende un IFN-beta sencillo fusionado a un dominio Fc de IgG mutado que contiene dos subunidades, la primera subunidad comprende un brazo Fc de IgG mutado no ligado a una proteína IFN-beta, la segunda subunidad comprende un brazo Fc de IgG mutado ligado a una proteína IFN-beta sencilla, donde dicha primera subunidad consiste en el SEQ ID NO: 3 y dicha segunda subunidad consiste en el SEQ ID NO: 8.
2. Un polinucleótido que codifica una proteína de acuerdo con la reivindicación 1.
3. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho polinucleótido comprende o consiste en el SEQ ID NO: 4 o el SEQ ID NO: 9.
- 10 4. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho polinucleótido comprende o consiste en el SEQ ID NO: 12.
5. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
6. Una célula anfitriona transformada con un vector de acuerdo con la reivindicación 5.
7. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicha célula es una célula CHO.
- 15 8. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de acuerdo con la reivindicación 1.
9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso como medicamento.
10. El uso de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- 20 11. Un método para elaborar una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho método comprende cultivar una célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, y aislar dicha proteína.

Figura 1

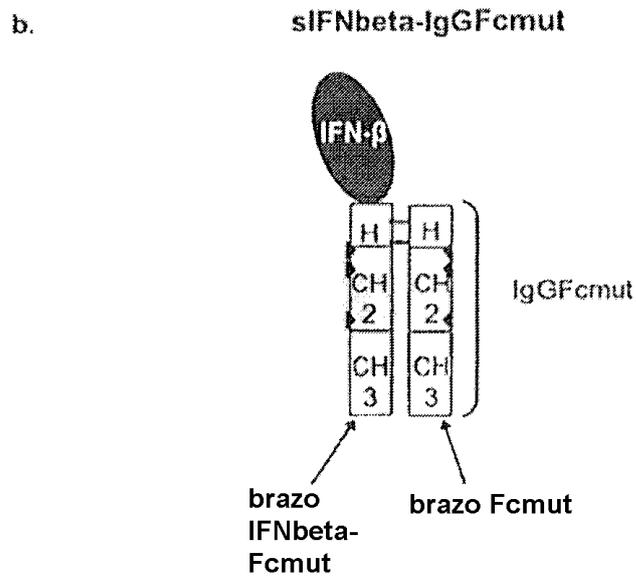
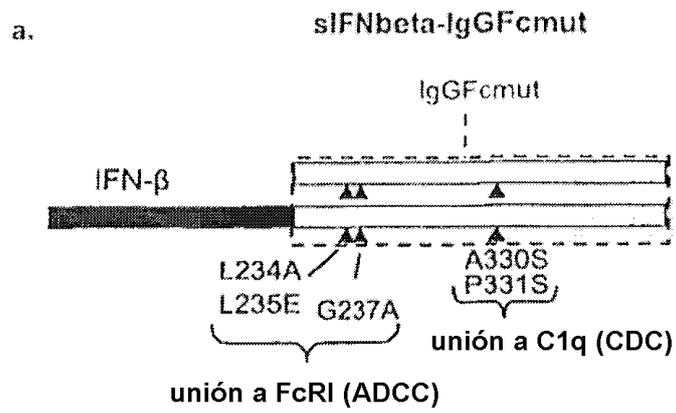


Figura 2

		1	50
hFC (del pico 8)	(1)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLHISRTPEVTCVVVDVSHED	
SEQ ID NO: 3	(1)	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLHISRTPEVTCVVVDVSHED	
Consenso	(1)	DKTHTCPPCPAPE G PSVFLFPPKPKDTLHISRTPEVTCVVVDVSHED	
		51	100
hFC (del pico 8)	(51)	PEVKFNUYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
SEQ ID NO: 3	(51)	PEVKFNUYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
Consenso	(51)	PEVKFNUYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
		101	150
hFC (del pico 8)	(101)	CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREENTKNOVSLTCLVK	
SEQ ID NO: 3	(101)	CKVSNKALPSSIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREENTKNOVSLTCLVK	
Consenso	(101)	CKVSNKALP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREENTKNOVSLTCLVK	
		151	200
hFC (del pico 8)	(151)	GFYPSDIAVEUESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRUQQG	
SEQ ID NO: 3	(151)	GFYPSDIAVEUESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRUQQG	
Consenso	(151)	GFYPSDIAVEUESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRUQQG	
		201	227
hFC (del pico 8)	(201)	NVFSCSVHREALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 3	(201)	NVFSCSVHREALHNHYTQKSLSLSPGK	
Consenso	(201)	NVFSCSVHREALHNHYTQKSLSLSPGK	

Figura 3

```

SEQ ID NO: 14 -----
SEQ ID NO: 1 ASTKGPSVFFLAPSSKETSGGTAALGCLVFLYPPEDYTVSMHSGALTSQVHTFPAYLQSS
SEQ ID NO: 3 -----

 dominio CH1 (1-98)

SEQ ID NO: 14 -----DKTHTCPFCPAPPELLGG
SEQ ID NO: 1 GLYSLSSVVTVPSSSLGTCYICNVHHPSTIVDKVVEPKSCDKTHTCPFCPAPPELLGG
SEQ ID NO: 3 -----DKTHTCPFCPAPAEAGA
*****

Región bisagra (99-110)

SEQ ID NO: 14 PSVFLPPPKKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA
SEQ ID NO: 1 PSVFLPPPKKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYH
SEQ ID NO: 3 PSVFLPPPKKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
*****

 dominio CH2 (111-223)

SEQ ID NO: 14 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
SEQ ID NO: 1 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRRE
SEQ ID NO: 3 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRRE
*****

 dominio CH3

SEQ ID NO: 14 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
SEQ ID NO: 1 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
SEQ ID NO: 3 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
*****

 (224-330)

SEQ ID NO: 14 QQGNVFSCSVMHEALHHHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 1 QQGNVFSCSVMHEALHHHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 3 QQGNVFSCSVMHEALHHHYTQKSLSLSPGK
*****

```

Figura 4

```

SEQ ID NO: 8 -----MSYNLLGF LQRSSNFQCQKLLUQLNGRLEYCLKDRMNF
SEQ ID NO: 15 -----MSYNLLGF LQRSSNFQCQKLLUQLNGRLEYCLKDRMNF
IFN-β HTRKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGF LQRSSNFQCQKLLUQLNGRLEYCLKDRMNF
      (péptido señal) *****

SEQ ID NO: 8 IPEETKQLQQFQKEDAALTYEMLQNIFAIFNQDSSSTGUNETIVENLLANVYHQINHLK
SEQ ID NO: 15 IPEETKQLQQFQKEDAALTYEMLQNIFAIFNQDSSSTGUNETIVENLLANVYHQINHLK
IFN-β IPEETKQLQQFQKEDAALTYEMLQNIFAIFNQDSSSTGUNETIVENLLANVYHQINHLK
      *****
      IFN-β

SEQ ID NO: 8 TVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKKEYSHCAUTIVRVEILRNFFYFNR
SEQ ID NO: 15 TVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKKEYSHCAUTIVRVEILRNFFYFNR
IFN-β TVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKKEYSHCAUTIVRVEILRNFFYFNR
      *****

                ↓ ↓ ↓
SEQ ID NO: 8 L TGYLRN-----DKTHTCPCPAPEAE LGGPSVFLFPFKPKDTLHISRTPEVTCVVVD
SEQ ID NO: 15 L TGYLRNEFGAARVDKTHTCPCPAPE LGGPSVFLFPFKPKDTLHISRTPEVTCVVVD
IFN-β L TGYLRN-----
      *****
      Ligador
      Bisagra

                #
SEQ ID NO: 8 VSHEDPEVKFNJYVDGVEVHMAKIKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
SEQ ID NO: 15 VSHEDPEVKFNJYVDGVEVHMAKIKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
      [dominio CH]

                ↓ ↓                § §
SEQ ID NO: 8 KALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEVESNG
SEQ ID NO: 15 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEVESNG
      dominio CH

SEQ ID NO: 8 QPENNYKITPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVIHEALHNHYTQKSLSLSP
SEQ ID NO: 15 QPENNYKITPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVIHEALHNHYTQKSLSLSP

SEQ ID NO: 8 GK
SEQ ID NO: 15 GK
    
```

Figura 5

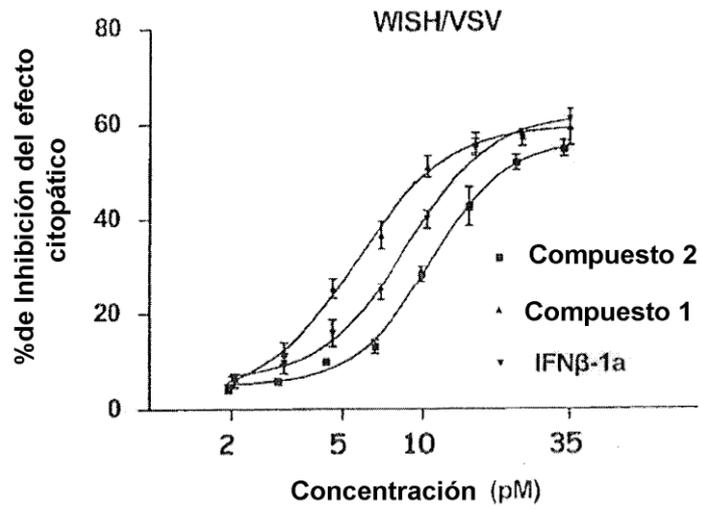


Figura 6

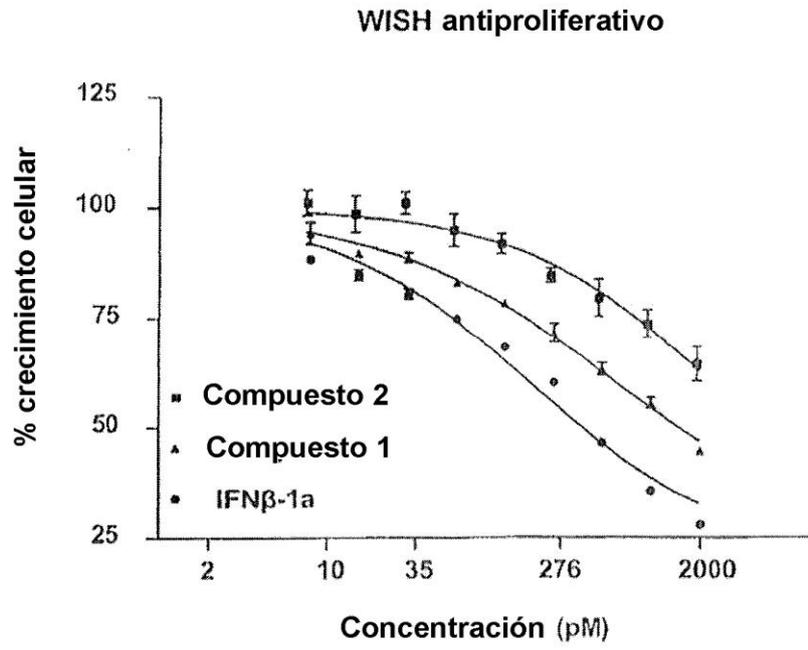


Figura 7

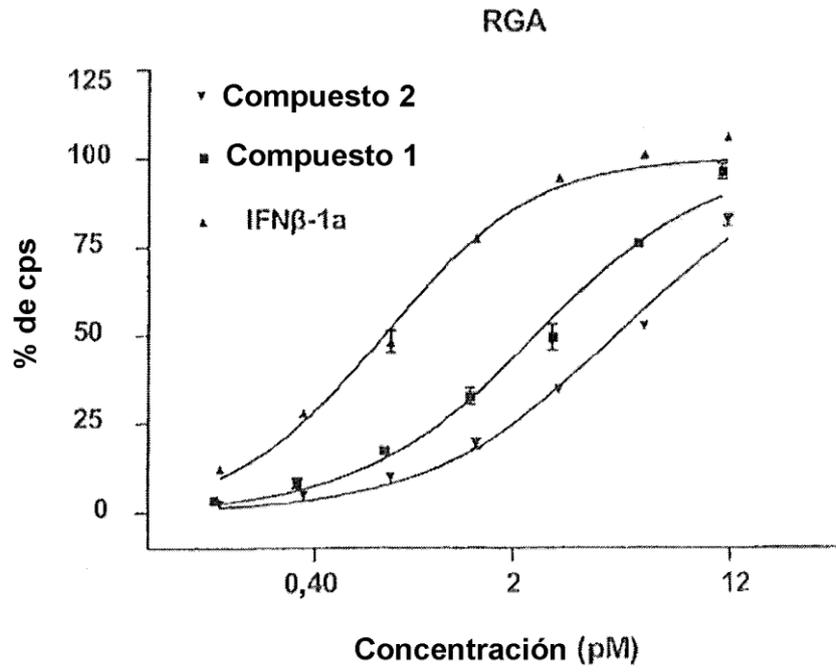
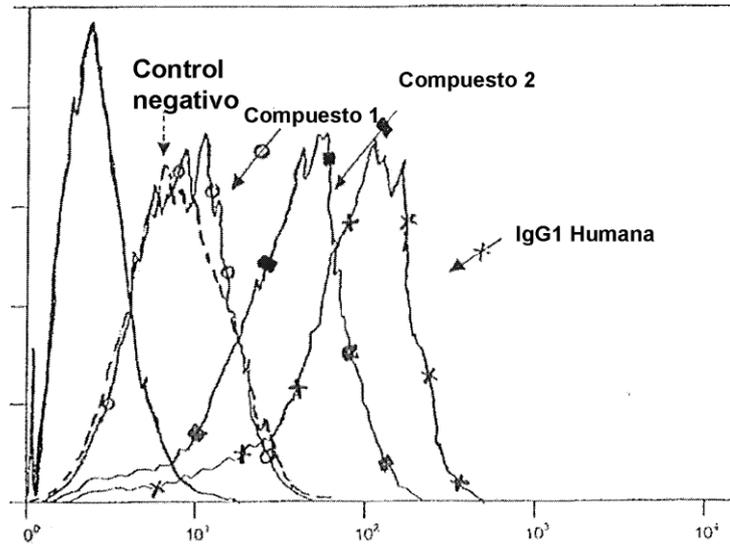


Figura 8

Recuento de Eventos



Unión relativa a células IIA1.6 transfectadas con CD64

Figura 9

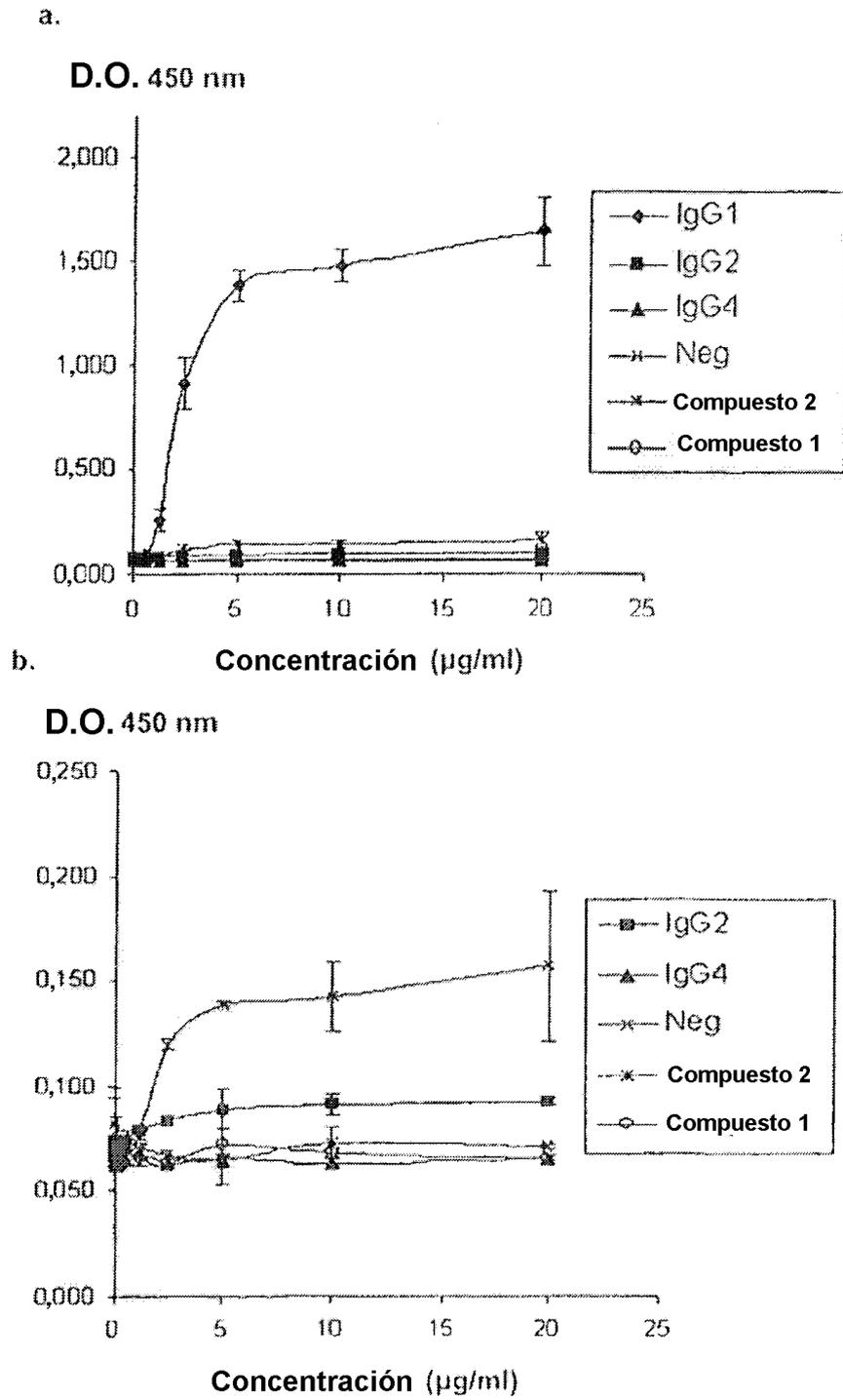


Figura 10

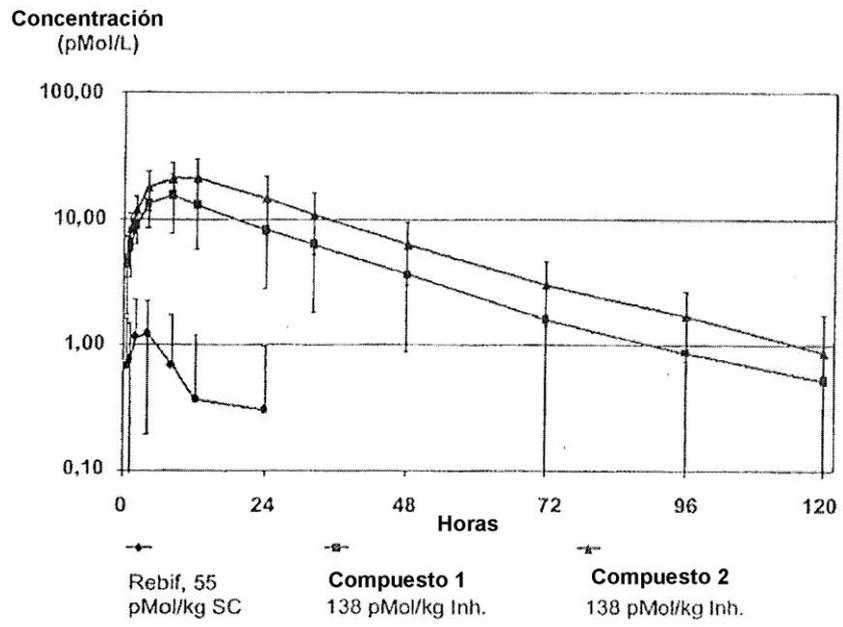


Figura 11

