

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 604**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008 E 08766022 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2162472**

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

30 Prioridad:

30.05.2007 US 940753 P

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

26.07.2013

73 Titular/es:

**POSTECH ACADEMY-INDUSTRY- FOUNDATION
(50.0%)**

**San 31 Hyoja-dong
Pohang-city, Kyungbuk-do 790-784, KR y
GENEXINE INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SUNG, YOUNG CHUL y
YANG, SEHWAN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 415 604 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de inmunoglobulina

5 **Campo técnico**

- 10 **[0001]** La presente invención se refiere a una proteína Fc híbrida humana y a una proteína de fusión de inmunoglobulina en la que la proteína Fc híbrida humana se une a una molécula biológicamente activa. En particular, se refiere a una proteína Fc híbrida humana, que se deriva de combinaciones de subtipos de la inmunoglobulina G humana (IgG) o combinaciones de la IgD y la IgG humanas, y una proteína de fusión en la que dicha proteína Fc está acoplada a una molécula biológicamente activa mediante un enlace covalente.

Antecedentes de la técnica

- 15 **[0002]** Las moléculas biológicamente activas pueden ser de gran interés terapéutico. Sin embargo, tienen muchas desventajas como agente terapéutico porque su estabilidad *in vivo* es baja. Su vida media en circulación o vida media en suero es corta debido a que se digieren por diversos enzimas en el cuerpo vivo. Por tanto se ha deseado mejorar la vida media en circulación de las moléculas biológicamente activas.

- 20 **[0003]** Se sabe que aumentando el tamaño de una proteína puede aumentar su vida media, ya que se evita que el riñón elimine la proteína (Knauf y col., J. Biol. Chem. 1988. 263: 15064-15070). Por ejemplo, se ha notificado un aumento de la estabilidad de la proteína mediante el acoplamiento de una proteína activa con la albúmina humana (Kinstler y col., Pharm. Res. 1995. 12: 1883-1888). Sin embargo, como el acoplamiento de una proteína activa con la albúmina humana aumenta solo ligeramente su tiempo de residencia, no ha sido un procedimiento eficaz para desarrollar una formulación farmacéutica eficaz que contenga la proteína activa que se acopla a la albúmina humana.

- 30 **[0004]** El otro procedimiento notificado es modular la glicosilación de una proteína. La glicosilación adicional en la proteína y la introducción de ácidos siálicos en las proteínas conduce a la prevención de la degradación de las proteínas en el hígado. Sin embargo, el aumento en la glicosilación de las proteínas conduce también a una disminución de la bioactividad de las proteínas.

- 35 **[0005]** Para estabilizar las proteínas y evitar la depuración renal, las proteínas se han conjugado con polietilenglicol. Se ha utilizado ampliamente la conjugación covalente con el PEG para administrar un fármaco de una vida media prolongada (Delgado y col., 1991. 9. 249-304. Sin embargo, se ha notificado que la conjugación de PEG con citocinas u hormonas da como resultado una afinidad de unión reducida del receptor debido al impedimento estérico producido por la conjugación.

- 40 **[0006]** Recientemente, se han investigado y desarrollado proteínas de fusión preparadas utilizando una inmunoglobulina (Ig). La Ig es un componente principal de la sangre. La Ig humana (hIg) incluye diversos tipos tales como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE (Roitt y col., "Immunology" 1989, Gower Medical Publishing, Londres, Reino Unido; Nueva York, N. Y.). Las IgG humanas se pueden clasificar adicionalmente en diversos subtipos conocidos como IgG1 humana (hIgG1), IgG2 humana (hIgG2), IgG3 humana (hIgG3), e IgG4 humana (hIgG4).

- 45 **[0007]** Las inmunoglobulinas están constituidas por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, que están asociadas mediante enlaces disulfuro para formar tetrámeros. Cada cadena está compuesta por una región variable y una región constante. La región constante de la cadena pesada se divide además en tres o cuatro regiones (CH1, CH2, CH3, y CH4), dependiendo de los isotipos. La porción Fc de la región constante de la cadena pesada, dependiendo del isotipo de Ig, incluye la región bisagra, los dominios CH2, CH3, y/o CH4.

- 50 **[0008]** Con respecto a la vida media en suero, la IgG1, IgG2, e IgG4 tienen vidas medias largas de 21 días, mientras que otras inmunoglobulinas tienen vidas medias relativamente cortas, de menos de una semana. Las proteínas quiméricas fusionadas con una porción de Fc de la IgG muestran un aumento de la estabilidad y un aumento de la vida media en suero (Capon y col., Nature 1989. 337: 525-531). Las proteínas biológicamente activas se han fusionado en el extremo N de la región CH1, el extremo N de la región Fc, o en extremo C de la región CH3 de las IgG.

- [0009]** En el periodo inicial, se han creado las proteínas de fusión de la IgG con los dominios extracelulares de

receptores superficiales celulares tales como CD4 (Capon y col., Nature 1989. 337: 525-531), TNFR (Mohler y col., J. Immunology 1993. 151: 1548-1561), CTLA4 (Linsley y col., J. Exp. Med. 1991. 173: 721-730), CD86 (Morton y col., J. Immunology 1996. 156: 1047-1054). También, existen algunas citocinas y hormonas de crecimiento que se han fusionado con los dominios de la IgG. Sin embargo, a diferencia de la fusión con los dominios extracelulares de los receptores superficiales celulares, la fusión con proteínas solubles con las IgG conduce a actividades biológicas reducidas, en comparación con las citocinas no fusionadas o los factores de crecimiento. Las proteínas quiméricas existen como dímeros, lo que conduce al impedimento estérico procedente de la interacción con sus receptores del tipo moléculas diana, debido a la presencia de dos proteínas activas en estrecha proximidad entre sí. Por tanto, debe superarse este problema para preparar una proteína de fusión eficaz.

[0010] La otra limitación de la tecnología de fusión de Fc es la presencia de respuestas inmunes indeseables. El dominio Fc de la inmunoglobulina tiene también funciones efectoras tales como la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Estas funciones efectoras se consiguen generalmente mediante la interacción entre la región Fc de la Ig y las FcR en las células efectoras o mediante la unión del complemento. Por tanto, debe llevarse a cabo el bloqueo de las funciones efectoras de la Fc para reducir las reacciones indeseables tales como la muerte celular, la liberación de citocinas, o la inflamación.

Divulgación de la invención

Problema técnico

[0011] En resumen, se necesitan proteínas de fusión de Fc mejoradas con una mínima pérdida de actividad biológica y con un riesgo disminuido de respuestas inmunes indeseadas.

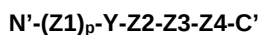
Solución técnica

[0012] La presente invención proporciona una proteína Fc híbrida, que se deriva de combinaciones de subtipos de la IgG humana o combinaciones de la IgD e IgG humanas. La región Fc híbrida es eficaz, cuando se une a una molécula biológicamente activa, para aumentar la vida media en suero de la molécula biológicamente activa así como para aumentar el nivel de expresión del polipéptido cuando se expresa un polipéptido que codifica una proteína de fusión del polipéptido Fc.

[0013] La presente invención proporciona también un polipéptido de fusión Fc híbrido en el que el Fc híbrido se une a una molécula biológicamente activa. La proteína de fusión se denomina algunas veces proteína de fusión de Fc-molécula activa o simplemente "proteína de fusión". La proteína de fusión puede tener un enlazador entre la FC y la molécula biológicamente activa. La Fc puede estar acoplada en su extremo N con un extremo C de la molécula biológicamente activa.

[0014] La proteína de fusión puede producirse fabricando una construcción de nucleótidos que codifica y es capaz de expresar la proteína de fusión; expresándola en una célula hospedadora; y cosechar la proteína de fusión. De forma alternativa puede producirse expresando un nucleótido que codifica la Fc y acoplando esta a una molécula biológicamente activa de una manera convencional.

[0015] De acuerdo con esto, en un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido representado por la siguiente fórmula:



en la que:

[0017] N' es el extremo N y C' es el extremo C del polipéptido.

[0018] Z1 es una secuencia de aminoácidos que consta de 5 a 9 restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de los restos de aminoácidos en las posiciones 90 a 98 de la SEQ ID NO: 14; Y es una secuencia de aminoácidos que consta de 5 o más restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de los restos de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14;

[0019] Z2 es una secuencia de aminoácidos que consta de los restos de aminoácidos en las posiciones 163 a 170

de la SEQ ID NO: 14;

Z3 es una secuencia de aminoácidos que consta de los restos de aminoácidos en las posiciones 121 a 220 de la SEQ ID NO: 13;

5

Z4 es una secuencia de aminoácidos que consta de los restos de aminoácidos en las posiciones 221 a 327 de la SEQ ID NO: 13; y p es un número entero de 0 o 1.

10 **[0020]** Z1 puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye 5-9 restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de los restos de aminoácidos en las posiciones 90-98 de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, Z1 puede ser 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácidos del extremo C de un dominio CH1 de la IgG1 (SEQ ID NO: 11) o de un dominio CH1 de la IgD (SEQ ID NO: 14).

15 **[0021]** Y puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye 5 o más, o 10 o más restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de los restos de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, Y puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye restos de aminoácidos en las posiciones 158 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 153 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 143 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 133 a 162 de la SEQ ID NO: 14, o restos de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14.

20 **[0022]** Z2 pueden ser 6 restos de aminoácidos del extremo N de un dominio CH2 de la IgG2 humana u 8 restos de aminoácidos del extremo N de un dominio CH2 de la IgD humana.

25 **[0023]** El número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 puede estar entre 80 y 140. En una realización, el número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 está entre 90 y 120, ambos inclusive. En otra realización, el número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 está entre 105 y 115, ambos inclusive. En una realización, el número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 es 108. En una realización adicional, el número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 es 109.

30

[0024] Z4 puede ser una secuencia de aminoácidos de los restos de aminoácidos en las posiciones 221 a 327 de la SEQ ID NO: 13.

35 **[0025]** En una realización, el polipéptido puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 26, y SEQ ID NO: 27. El polipéptido es una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 28, and SEQ ID NO: 29.

40 **[0026]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico que es una fusión que comprende un polipéptido tal como se define en el presente documento y un polipéptido, proteína o péptido fusionado en el extremo N o el extremo C del polipéptido, denominado "molécula biológicamente activa". La molécula biológicamente activa puede ser una proteína soluble tal como, pero sin limitarse a, una hormona, citocina, factor de crecimiento, una molécula coestimuladora, receptor de hormonas, receptor de citocinas, receptor de factores de crecimiento, o péptido corto. La molécula biológicamente activa puede ser EPO o sus variantes/fragmentos, p40 o sus variantes/fragmentos (por ejemplo, variante p40 que contiene una sustitución Asn303Gln, G-CSF o sus variantes/fragmentos, los receptores de TNF, GM-CSF, los receptores de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-10, TGF-beta, el receptor de TGF-beta, IL-17, el receptor de IL-17, el Factor VII, CXCL-11, FSH, la hormona del crecimiento humano, la proteína-1 morfogenética del hueso (BMP-1), CTLA4, PD-1, 45 GLP-1, la betacelulina, OPG, RNAK, el interferón alfa, el interferón beta o sus variantes/fragmentos. La molécula biológicamente activa puede ser una proteína secretada, que puede estar en una forma madura.

50 **[0027]** En una realización, se proporciona un procedimiento para producir el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende las etapas de. (i) introducir una molécula de ADN que codifica el polipéptido en una célula hospedadora de mamífero (ii) hacer crecer la célula en condiciones en las que se pueda expresar el polipéptido en su medio de crecimiento; y (iii) cosechar el polipéptido expresado. La célula hospedadora de mamífero puede ser una de entre células CHO, COS o BHK.

[0028] En otra realización, se proporciona un procedimiento para (i) reducir los síntomas de, evitar o tratar una

enfermedad autoinmune, (ii) inhibir el rechazo de un injerto, o (iii) tratar o evitar el shock inducido por endotoxinas, que incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido descrito anteriormente, en el que el polipéptido se fusiona a una molécula biológicamente activa.

5 **[0029]** En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. El polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 28, y SEQ ID NO: 29. La molécula de ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,
10 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 26, o SEQ ID NO: 27. La molécula de ácido nucleico puede incluir además una secuencia señal o secuencia líder.

[0030] De acuerdo con una realización de la invención, se proporcionan un vector de expresión que incluye la molécula de ácido nucleico y la célula hospedadora que contiene el vector. Los ejemplos de vectores de expresión
15 pueden incluir, pero no se limitan a, pAD1 EPO-hFc-1, pAD11 G-CSF-hFc-1, pAD11 p40N303Q-hFc-1, pAD11 EPO-hFc-6, pAD11 IG-CSF-hFc-6, pAD11 p40N303Q-hFc-6, pAD11 EPO-hFc-5, pAD11 G-CSF-hFc-5, pAD11 p40N303Q-hFc-5 and pAD11 TNFR-hFc-5.

[0031] En una realización, se proporciona un procedimiento para administrar moléculas biológicamente activas a
20 un mamífero que incluye la etapa de administrar la molécula de ácido nucleico al mamífero que lo necesita.

[0032] En otra realización, un polipéptido incluye un dominio Fc que consta de una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 en una dirección del extremo N al extremo C, en el que dicha región bisagra incluye al menos una porción de restos de aminoácidos de un dominio CH2 de la IgG4 humana, en el que 4-37 restos de aminoácidos
25 consecutivos en el extremo N del dominio CH2 de la IgG4 humana están sustituidos con al menos una porción de restos de aminoácidos de la región del extremo N del dominio CH2 de la IgG2 humana o la región del extremo N del dominio CH2 de la IgD humana, y dicho dominio CH3 incluye al menos una porción de restos de aminoácidos de un dominio CH3 de la IgG4 humana.

[0033] La región bisagra puede incluir al menos una porción de restos de aminoácidos de la región bisagra de la IgG1 humana, dicho dominio CH2 incluye al menos una porción de restos de aminoácidos del dominio CH2 de la IgG4, en el que 4-37 restos de aminoácidos en el extremo N del dominio CH2 de la IgG4 humana están sustituidos con al menos una porción de los restos de aminoácidos de la región del extremo N del dominio CH2 de la IgG2 humana.
30

[0034] La región bisagra puede incluir al menos una porción de restos de aminoácidos de la región bisagra de la IgD humana, dicho dominio CH2 incluye al menos una porción de restos de aminoácidos del dominio CH2 de la IgG4 humana, en el que 4-37 restos de aminoácidos en el extremo N del dominio CH2 de la IgG4 humana están sustituidos con al menos una porción de los restos de aminoácidos de la región del extremo N del dominio CH2 de la IgD humana.
35 40

[0035] El polipéptido puede incluir además un dominio CH1, en el que dicho dominio CH1 incluye al menos una porción de restos de aminoácidos del dominio CH1 de la IgG1 humana, y en el que dicho dominio CH1 está acoplado al extremo N de dicha región bisagra. El polipéptido puede incluir además un dominio CH1, en el que dicho dominio CH1 incluye al menos una porción de restos de aminoácidos del dominio CH1 de la IgD humana, y en el que dicho dominio CH1 está acoplado al extremo N de dicha región bisagra. El polipéptido puede incluir además un segundo polipéptido acoplado al extremo N de dicha región bisagra, en el que el segundo polipéptido es un polipéptido no de inmunoglobulina biológicamente activo. El polipéptido puede incluir además una molécula biológicamente activa acoplada al extremo N de dicho dominio CH1 o al extremo C de dicho dominio CH4 mediante
45 un enlazador, en el que dicha molécula biológicamente activa no es un polipéptido de la inmunoglobulina. El polipéptido y la molécula biológicamente activa pueden estar acoplados entre sí mediante un enlazador. La molécula enlazadora es una albúmina enlazadora o un enlazador sintético. La albúmina enlazadora comprende la secuencia de aminoácidos 321 a 323, 318 a 325, 316 a 328, 313 a 330, 311 a 333, o 306 a 338 de la SEQ ID NO: 25. El enlazador sintético puede ser un péptido de 10 a 20 restos de aminoácidos compuestos por restos de Gly y Ser. En
50 una realización, dicho enlazador de Gly-Ser es GGGGSGGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 32).
55

[0036] La presente invención abarca también una molécula de anticuerpo que comprende una región Fc recombinante, la región Fc recombinante se describe como anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

[0037] La Fig. 1 muestra el diagrama esquemático de las Fc híbridas (hFc) que se pueden usar como proteínas portadoras de moléculas activas designadas como "X".

[0038] La Fig. 2 muestra las representaciones esquemáticas de las hFc siguiendo la descripción de las posiciones de aminoácidos derivadas de la IgG1 (SEQ ID NO: 11), IgG2 (SEQ ID: 12), IgG4 (SEQ ID: 13) e IgD (SEQ ID: 14). Se aplica la misma regla a la designación de las posiciones de aminoácidos en el polipéptido a lo largo de la solicitud, a no ser que se indique otra cosa.

[0039] La Fig. 3 muestra la representación esquemática de las hFc en la que cada una está conjugada a moléculas biológicamente activas designadas como "X" en el extremo C mediante un péptido enlazador de albúmina designado como "AL".

[0040] La Fig. 4 muestra representaciones esquemáticas de las hFc conjugadas con enlazadores siguiendo la descripción detallada acerca de las posiciones de los aminoácidos de los enlazadores de la albúmina derivados de la albúmina humana (SEQ ID NO: 25).

[0041] La Fig. 5 muestra los resultados de la gráfica de hidrofobicidad de la hFc-6.

[0042] La Fig. 6(a) muestra los resultados de las actividades de unión de FcγRI de MabThera® (Rituximab), hIgG1, Enbrel® (etanercept), EPO-hFc-5, G-CSF-hFc-5, p40N303Q-hFc-5 utilizando el ensayo ELISA específico; la Fig. 6(b) muestra los resultados de las actividades de unión de Clq de MabThera® (Rituximab), hIgG1, Enbrel® (etanercept), EFO-hFc-5, G-CSF-hFc-5, p40N303Q-hFc-5 utilizando el ensayo ELISA específico.

[0043] La Fig. 7(a) muestra los resultados de las bioactividades de EPO-IgG1 Fc, EFO-hFc-1, EFO-hFc-5, EPO-hFc-6 y Aranesp® (darbepoetina alfa), en comparación con la de EPO en la línea de células F36E; la Fig. 7(b) muestra los resultados de las bioactividades in vitro de Neulasta® (pegfilgrastim) y G-CSF-hFc-5 en una línea de células hematopoyéticas de ratón (NFS-60), la Fig. 7(c) muestra los resultados de Enbrel® (etanercept) y TNFR-hFc-5 en células L929 de murino, y la Fig. 7(e) muestra los resultados de las bioactividades in vitro de thFc-1-AL(0)-IFN-beta and thFc-1-AL(3)-IFN-beta en células WISH humanas.

[0044] La Fig. 8(a) muestra los resultados de la vida media in vivo de Aranesp® (darbepoetina alfa), EPO-hFc-1, o EPO-hFc-5 mediante la ruta SC (panel izquierdo) y la ruta IV (panel derecho), la Fig. 8(b) muestra los resultados de la farmacocinética de LEUCOSTIM® (filgrastim) y G-CSF-hFc-1 administrados a ratas Sprague Dawley mediante la ruta SC (panel izquierdo) y la ruta IV (panel derecho), la Fig. 8(c) muestra los resultados de la farmacocinética de p40N303Q-hFc-5 and Enbrel® (etanercept) administrados a monos cynomolgus Sprague Dawley mediante la ruta SC. La Fig. 8(d) muestra los resultados de la farmacocinética de TNFR-hFc-5 y Enbrel® (etanercept) administrados a ratas Sprague Dawley mediante la ruta SC.

[0045] La Fig. 9(a) muestra los resultados de las bioactividades in vivo de Aranesp® (darbepoetina alfa) y EPO-hFc-5 administrados a monos cynomolgus mediante la ruta SC (panel superior izquierdo) y la ruta IV (panel superior derecho) y la Fig. 9(b) muestra los resultados de las bioactividades in vivo de LEUCOSTIM® (filgrastim) y G-CSF-hFc-1 administrados a ratas Sprague Dawley mediante la ruta SC (panel superior) y la ruta IV (panel inferior).

Mejor modo de llevar a cabo la invención.

[0046] La presente invención proporciona un fragmento de Fc híbrido de la inmunoglobulina humana que incluye una región bisagra, y un dominio CH2 y un dominio CH3 en una dirección del extremo N al extremo C, en el que la región bisagra es una secuencia de aminoácidos al menos parcial de una región bisagra de la IgD humana o una región bisagra de la IgG1 humana; y el dominio CH2 es un dominio CH2 de la IgG4 humana, una porción de la cual, en su región del extremo N, está sustituida por 4-37 restos de aminoácidos de una región del extremo N de un dominio CH2 de la IgG2 humana o un dominio CH2 de la IgD humana. Dicho fragmento de Fc híbrido, cuando se une a una molécula biológicamente activa, tal como un polipéptido biológicamente activo de la molécula biológicamente, para producir una proteína de fusión de Fc, minimiza las inmunoreacciones no específicas de la proteína de fusión de Fc, prolonga la vida media en suero del polipéptido biológicamente de la molécula biológicamente activa, y optimiza la actividad del polipéptido biológicamente activo de la molécula biológicamente activa.

[0047] En la proteína de fusión de Fc de acuerdo con una realización de la presente invención, la combinación del dominio CH2 de la IgD del extremo N con la porción restante del dominio CH2 de la IgG4 se ha diseñado para que la región de la proteína de fusión resultante en la que dos diferentes subunidades de Ig se recombinan sea hidrófoba. La región hidrófoba de la proteína fusionada resultante se localizará en el interior de una proteína plegada, minimizando la reacción inmune no específica no deseada.

[0048] El término “fragmento de Fc” o “Fc”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que contiene la región 1 constante de la cadena pesada. (CH1), la región 2 constante de la cadena pesada (CH2) y la región 3 constante de la cadena pesada (CH3) de una inmunoglobulina, y no las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, y la región 1 constante de la cadena ligera (CL1) de la inmunoglobulina. Puede incluir adicionalmente la región bisagra y la región constante de la cadena pesada. Fc híbrido o fragmento de Fc híbrido se denomina algunas veces en el presente documento como “hFc”.

[0049] Además, el fragmento de Fc de la presente invención puede estar en la forma de tener cadenas naturales de azúcar, un mayor número de cadenas de azúcar en comparación con una forma natural o un menor número de cadenas de azúcar en comparación con la forma natural, o puede estar en forma deglicosilada. El aumento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar del Fc de la inmunoglobulina se pueden conseguir mediante procedimientos habituales en la técnica, tales como procedimientos químicos, procedimientos enzimáticos y procedimientos de genomanipulación utilizando un microorganismo. La eliminación de las cadenas de azúcar de un fragmento de Fc da como resultado una fuerte disminución en la afinidad de unión a la parte Clq del primer componente C1 del complemento y una disminución o pérdida en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), no induciendo de esta forma respuestas inmunes innecesarias in vivo. A este respecto, un fragmento de Fc de la inmunoglobulina en una forma deglicosilada o aglicosilada puede ser, en algunos casos, más adecuado para el objeto de la presente invención como fármaco portador.

[0050] Tal como se usa en el presente documento, el término “deglicosilación” se refiere a que estos restos de azúcar se eliminan enzimáticamente de un fragmento de Fc, y el término “aglicosilación” significa que se produce un fragmento de Fc en una forma no glicosilada por un procariota, preferiblemente *E. coli*.

[0051] El término “híbrido”, tal como se usa en el presente documento, significa que las secuencias que codifican dos o más fragmentos de Fc de inmunoglobulinas de diferente origen están presentes en un fragmento de Fc de la inmunoglobulina monocatenaria.

[0052] En una realización, el Fc humano híbrido incluye una región bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3 en una dirección del extremo N al extremo C, en el que la región bisagra es una secuencia de aminoácidos al menos parcial de una región bisagra de la IgD humana o una región bisagra de la IgG1 humana, y el dominio CH2 es un dominio CH2 de la IgG4 humana, una porción del cual, en su región del extremo N, está sustituida por 4-37 restos de aminoácidos de una región del extremo N de un dominio CH2 de la IgG2 humana o un dominio CH2 de la IgD humana. El Fc híbrido humano se puede unir por su extremo N al extremo C de una molécula biológicamente activa mediante un enlace covalente.

[0053] Los polipéptidos de la fórmula $N^{\prime}\text{-X-(Z1)}_p\text{-Y-Z2-Z3-Z4-C}^{\prime}$ y $N^{\prime}\text{-(Z1)}_p\text{-Y-Z2-Z3-Z4-(enlazador)}_q\text{-X-C}^{\prime}$ aumentan la vida media en circulación de la molécula X biológicamente activa en comparación con la vida media en circulación de X solo, cuando se administran a un sujeto.

[0054] El enlazador puede derivarse de la albúmina humana (CAA00606 SEQ ID NO: 25). El enlazador puede comprender la secuencia de aminoácidos 321 a 323, 318 a 325, 316 a 328, 313 a 330, 311 a 333, o 306 a 338 de la SEQ ID NO: 25. De forma alternativa, el enlazador puede ser un enlazador sintético. El enlazador sintético puede ser un péptido compuesto por un total de 10-20 restos de Gly y Ser. En una realización, el enlazador de Gly-Ser es GGGGSGGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 32).

[0055] Z1 puede comprender al menos una porción del dominio CH1 de la IgD (SEQ ID NO: 14). Z1 puede comprender 5 a 9 o 7 a 9 restos de aminoácidos consecutivos de la región del extremo C del dominio CH1 de la IgD (posiciones 90-98 de la SEQ ID NO: 14). En algunas realizaciones, Z1 puede tener 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácidos en el extremo C del dominio CH1 de la IgD.

[0056] Y puede comprender al menos una porción de la región bisagra de la IgD humana. Y puede comprender 5 o más, o 10 o más restos de aminoácidos consecutivos de la región bisagra de la IgD (aminoácidos en las

posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14). En determinadas realizaciones, Y puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye restos de aminoácidos en las posiciones 158 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 153 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 143 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 133 a 162 de la SEQ ID NO: 14, o restos de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14.

[0057] 8 restos de aminoácidos del extremo N de un dominio CH2 de la IgD humana (los restos de aminoácidos 163-170 de la SEQ ID NO: 14).

10 **[0058]** Z4 puede ser restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de la IgG4 (restos de aminoácidos en las posiciones 221 a 327 de la SEQ ID NO: 13), que corresponden a los restos de aminoácidos 341-447 de la IgG4 humana, tal como se numeran de acuerdo con el Índice EU, de acuerdo con Kabat (que corresponde a los restos de aminoácidos en las posiciones 221-327 de la SEQ ID NO: 13).

15 **[0059]** En otra realización, Y puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una porción de la región del extremo C de la región bisagra de la IgD humana (restos de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14), p puede ser 1 o 0 (cero), Z2 puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una porción de la región del extremo N del dominio CH2 de la IgD humana (restos de aminoácidos en las posiciones 163 a 199 de la SEQ ID NO: 14), y Z3 puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una porción de la región del extremo C del dominio CH2 de la IgG4 humana (restos de aminoácidos en las posiciones 121 a 220 de la SEQ ID NO: 13). Por ejemplo, Y puede ser restos de aminoácidos en las posiciones 158 a 162, 133 a 162, o 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14, Z2 puede ser los restos de aminoácidos en las posiciones 163 a 170 de la SEQ ID NO: 14, y Z3 puede ser los restos de aminoácidos en las posiciones 121-220 de la SEQ ID NO: 13.

25 **[0060]** En esta realización, cuando p es 1, Z1 puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye la región del extremo C del dominio CH1 de la IgD humana (restos de aminoácidos en las posiciones 90 a 98 de la SEQ ID NO: 14). Por ejemplo, Z1 puede ser los restos de aminoácidos 90 a 98 de la SEQ ID NO: 14.

[0061] En esta realización, Y puede ser 20 restos de aminoácidos consecutivos o más, 30 restos de aminoácidos consecutivos o más, 40 restos de aminoácidos consecutivos o más, 50 restos de aminoácidos consecutivos o más, o 60 restos de aminoácidos consecutivos o más del lado del extremo C de la región bisagra de la IgD humana (restos de aminoácidos en las posiciones 99-162 de la SEQ ID NO: 14). Z3 puede comprender 71 a 100 restos de aminoácidos consecutivos del lado del extremo C de los restos de aminoácidos en las posiciones 121-220 de la SEQ ID NO: 13. El número total de los restos de aminoácidos de Z2 y Z3 puede ser 108.

35 **[0062]** La Tabla 1 muestra las secuencias de aminoácidos de los fragmentos de la IgG1, IgG2, IgG3 e IgD útiles en la construcción de los hFc de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

[0063] Tabla 1

40

[Tabla 1]

dominio hFc	Intervalo aceptable de los fragmentos de Ig	Secuencia del fragmento más largo en el intervalo aceptable, en la dirección del extremo N al extremo C	SEQ ID NO:	Localización en la SEQ ID	Localización en el índice EU *
CH1(Z1)	5-9 restos de aminoácidos del extremo C del CH1 de la IgG1	SNTK <u>V</u> DKRV**	11	90-98	207-215
	5-9 restos de aminoácidos del extremo C del CH1 de la IgD	ASKS <u>K</u> KEIF	14	90-98	No disponible
Bisagra	5-15 restos de aminoácidos del extremo C de la región bisagra de la IgG1	EPKSCDKTHT <u>C</u> PPCP	11	99-113	216-230
	5-64 aminoácidos del extremo C de la región bisagra de la IgD	RWPESPKAQASSVPT AQPQAEGSLAKATTA PATTRNTGRGEEKK KEKEKEEQEERETKTP ECP	14	99-162	No disponible
CH2, lado del extremo N (Z2)	4-37 restos de aminoácidos del extremo N	<u>APPVAG</u>PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTWV VVDVSH	12	111-147	231-267
	CH2 de la IgG2				
	4-37 restos de aminoácidos del extremo N del dominio CH2 de la IgD	<u>SHTQ</u>PLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFV VGSDLKD	14	163-199	No disponible

CH2, lado del extremo C (Z3) + CH3 (Z4)	71-106 restos de aminoácidos del extremo C del CH2 de la IgG4 + 80-107 restos de aminoácidos del dominio CH3 de la IgG4	LGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD <u>VSQEDPEVOFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEO</u> <u>FNSTYRVVSVLTVLH</u> <u>ODWLNGKEYKCKVS</u> <u>NKGLPSSIEKTISKAK</u> +GPREPOVYTLPSQ <u>EEMTKNOVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNG</u> <u>OPENNYKTTPPVLD</u> <u>DGSFFLYSRLTVDKSR</u> <u>WOEGNVFSCSVMHE</u> ALHNHYTQKSLSL GK	13	115-220 + 221-327	235-340 + 341-447
	71-106 restos de aminoácidos del extremo C del CH2 de la IgG3 + 80-107 restos de aminoácidos del extremo N del dominio CH3 de la Ig3	LGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD <u>VSHEDPEVOFKWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEO</u> <u>YNSTFRVSVLTVLH</u> <u>ODWLNGKEYKCKVS</u> <u>NKALPAPIEKTISKTK+</u> <u>GPREPOVYTLPSRE</u> <u>EMTKNOVSLTCPVKG</u> <u>EYPSDIAVEWESSGOP</u> <u>ENNYNTTPPMLDSG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRW</u> <u>QOQGNIFSCSVMHEAL</u> HNRFTQKS LSLSPGK	24	165-270 + 271-377	235-340 + 341-447

71-106 restos de los aminoácidos del extremo C del CH2 de la IG2 +	VAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTWVVVD <u>VSHEDPPEVOFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEO</u> <u>ENSTFCVVSVLTVVH</u>	12	114-219 + 220-326	234-340 +341-447
80-197 restos de aminoácidos del extremo N del dominio CH3 de la IgG2	<u>ODWLNGKEYKCKVS</u> <u>NKGLPAPIEKTISKTK-</u> <u>GOPREPOVYTLPSRE</u> <u>EMTKNOVSLTCLVKC</u> <u>FYPSDIAVEWESNGOP</u> <u>ENNYKTTPMLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRW</u> <u>QOQNVFSCSVMHEAL</u> HNHYTQKSLSLSPGK			

71-106 restos de aminoácidos del extremo C del CH2 de la IgG1 + 80-107 restos de aminoácidos del extremo N LGGPSVFL FPPKPKDT LMISRTPE VTCVVVD <u>VSHEDPEV</u> <u>KENWYVD</u> <u>GVEVHNA</u> <u>KTKPREEQ</u> <u>YNSTYRVV</u> <u>SVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKE</u> <u>YKCKVSN</u> <u>KALPAPIE</u> <u>KTISKAK+</u> <u>GOPREPOV</u> <u>YTLPSRD</u> <u>ELTKNOVS</u> <u>LTCLVKGE</u> <u>YPSDIAVE</u> <u>WESNGOPE</u> <u>NNYKTIPP</u> <u>VLDS DGSE</u> <u>FLYSKLTV</u> <u>DKSRWQQ</u> <u>GNVFSCSV</u> MHEALHN HYTQKSLS LSPGK	11	118- 223 + 224- 330	235-340 341-447	
---	-----------	--	----------------------------	--

[0064] * el índice EU se describe en "Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, United States Department of Health and Human Services."

5 [0065] ** la región subrayada en cada una de las secuencias de aminoácidos indica los fragmentos más cortos de

la gama de restos de aminoácidos aceptables.

[0066] En una realización, la presente invención proporciona una Fc híbrida que es una de hFc-1, hFc-2, hFc-3, hFc-4, hFc-5, o hFc-6, tal como se muestra en las Fig. 1 y 2, o la thFc-1 o thFc-2 que se muestra en las Fig. 3 y 4. Aunque las Figs. 1 y 3 representan Fc bicatenarias, la presente invención también abarca moléculas de Fc híbridas monocaténarias. Las secuencias de aminoácidos de hFc-1 a hFc-6 se muestran en las SEQ ID NOs: 18-23, respectivamente y las secuencias de aminoácidos de thFc-1 y thFc-2 se muestran en la SEQ ID NO: 28 y la SEQ ID NO: 29, respectivamente. La presente invención abarca también moléculas de polinucleótidos que codifican la Fc híbrida. Incluyen, pero no se limitan a, una secuencia de polinucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1 (hFc-1), SEQ ID NO: 2 (hFc-2), SEQ ID NO: 3 (hFc-3), SEQ ID NO: 4 (hFc-4), SEQ ID NO: 5 (hFc-5), SEQ ID NO: 6 (hFc-6), SEQ ID NO: 26 (thFc-1) and SEQ ID NO: 27 (thFc-2).

[0067] Se conocen en la técnica las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas humanas y están depositadas en un depositario públicamente disponible. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de la región constante de la IgG1 humana, la región constante de la IgG2 humana, la región constante de la IgG3 humana, la región constante de la IgG4 humana, y la región constante de la IgD humana están disponibles en CAA75032, CAC20455, CAC20456, AAH25985 y P01880, respectivamente. Estas secuencias se reprodujeron como la SEQ ID NO: 11, 12, 24, 13 and 14, respectivamente.

[0068] Una molécula X biológicamente activa puede ser una proteína soluble. Puede incluir, pero no se limita a, una hormona, citocina, factor de crecimiento, molécula coestimuladora, receptor de hormonas, receptor de citocinas, receptor de factores de crecimiento, o péptidos cortos. Por ejemplo, X puede ser un receptor de EPO, p40, G-CSF, TNF o sus variantes/fragmentos. X puede ser un receptor de GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, TGF-beta, receptor de TGF-beta IL-17 receptor de IL-17, Factor VII, CXCL-11, FSH, hormona del crecimiento humano, proteína 1 morfogenética del hueso, CTLA4, PD-1, GLP-1, betacelulina, OPG, RANK, interferón alfa, interferón beta o sus variantes/fragmentos, puede incluir también, pero sin limitarse a, una región Fab de un anticuerpo. La molécula biológicamente activa puede ser también una proteína secretada. En una realización, la molécula biológicamente activa no pertenece a la familia de las inmunoglobulinas.

[0069] El término "variante" se refiere a un polinucleótido o ácido nucleico que difiere de un ácido nucleico o polipéptido de referencia, pero que retiene las propiedades esenciales del mismo. Generalmente, las variantes son globalmente muy similares y, en muchas regiones, idénticas al ácido nucleico o polipéptido de referencia. También, el término "variante" se refiere a una porción biológicamente activa de una molécula biológicamente activa de fármaco, y que retiene al menos una de sus propiedades funcionales y/o terapéuticas tal como se describe en cualquier parte del presente documento o se conoce de otra forma en la técnica. Generalmente, las variantes son globalmente muy similares, y, en muchas regiones, idénticas a la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés biológicamente activa.

[0070] La presente invención proporciona también proteínas que comprenden, o constan de forma alternativa de, una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, idéntica a, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos, tal como se muestra en las SEQ ID NOs: 18-23 y 28-29. Se proporcionan también fragmentos de estos polipéptidos. Los polipéptidos adicionales abarcados por la invención son polipéptidos codificados por los nucleótidos que se hibridan con el complemento de una molécula de ácido nucleico que codifica los polipéptidos de la invención en condiciones de hibridación restrictiva (por ejemplo, hibridación a un filtro unido al ADN en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45° C seguido por uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1% a aproximadamente 50-65° C) en condiciones muy restrictivas (por ejemplo, hibridación a un filtro unido a ADN en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45° C, seguido por uno más lavados en 0,1 x SSC, SDS al 0,2% a aproximadamente 68° C), o en otras condiciones de hibridación restrictivas que conocen los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. y col., eds., 1989 Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & Sons Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1 6.3.6 y 2.10.3). los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos están también abarcados por la invención.

[0071] En un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, un 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos solicitada, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido sujeto sea idéntica a la secuencia solicitada excepto en que la secuencia polipeptídica sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos solicitada. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos solicitada, hasta un 5% de los restos de aminoácidos de la secuencia se puede invertir,

eliminar o sustituir con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones de los extremos amino o carboxi de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier sitio entre aquellas posiciones terminales, intercaladas tanto individualmente entre restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia.

5

[0072] Desde el punto de vista práctico, se puede determinar de forma convencional utilizando programas informáticos conocidos que cualquier polipéptido particular es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la albúmina de la invención o uno de sus fragmentos. Un procedimiento preferido para determinar la mejor correspondencia global entre una secuencia solicitada (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeta, denominado alineación de la secuencia global, se puede determinar utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag y col. (Comp. App. Biosci. 6: 237 245 (1990)). En una alineación de secuencias, las secuencias solicitada y sujeta son ambas secuencias de nucleótidos o son ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de la alineación de la secuencia global se expresa como porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos utilizados en la alineación de aminoácidos por FASTDB son: Matriz = PAM 0, valor k-tupla = 2, Penalización por error de emparejamiento = 1, Penalización por unión = 20, Longitud del grupo de aleatorización = 0, Puntuación por corte = 1, Tamaño de ventana = longitud de la secuencia, Penalización por hueco = 5, Penalización por tamaño de hueco = 0,05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos sujeta, lo que sea más corto.

[0073] La variante tendrá usualmente al menos un 75% (preferiblemente al menos aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99%) de identidad de la secuencia con una longitud de HA normal o de la proteína terapéutica que tenga la misma longitud que la variante. La homología o identidad en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos se determina mediante análisis BLAST (Herramienta Básica de Investigación de la Alineación Local), utilizando el algoritmo empleado por los programas blastn, blastx, tblastn y tblastx (Karlin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264 2268 (1990) y Altschul, J. Mol. Evol. 36: 290 300 (1993) que se hacen a medida para la investigación de la similitud de la secuencia.

[0074] Las variantes de polinucleótidos de la invención pueden contener alteraciones en las regiones de codificación, regiones no codificantes, o ambas. Especialmente preferidas son las variantes de polinucleótidos que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones, o eliminaciones silenciosas, pero que no alteran las propiedades o las actividades del polipéptido codificado. Se prefieren las variantes de nucleótidos producidas por sustituciones silenciosas debidas a la degeneración del código genético. Además, se prefieren también las variantes de polipéptidos en las que menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10, o 5-50, 5-25, 5-10, 1-5, o 1-2 aminoácidos se sustituyen, eliminan, añaden en cualquier combinación. Se pueden producir variantes de polinucleótidos por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón de un hospedador concreto (cambio de codones en el ARNm humano por los preferidos por un hospedador bacteriano, tales como, levadura o E. coli).

[0075] A fin de construir diversas proteínas de fusión de Fc tales como la construcción de fusión EPO-Fc, la construcción de fusión G-CSF-Fc, o la construcción de fusión p40-Fc humana, las secuencias de aminoácidos de la EPO humana, G-CSF humano, p40 humana, y el receptor de TNF humano están disponibles de NP_000790 (SEQ ID NO: 15), CAA27291 (SEQ ID NO: 16), AAG32620 (SEQ ID NO: 17), y NP_001057 (SEQ ID NO: 31), respectivamente. En una realización, está vinculada al polipéptido una p40 humana en la que el resto del aminoácido Asn en la posición 303 está sustituido por Gln.

45

[0076] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo completo que contiene la región Fc genomanipulada. El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento incluye anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpos que incluyen al menos dos de CH1, la región bisagra, CH2 o CH3. Se prefieren anticuerpos monoclonales completos. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo se selecciona por su especificidad de unión y puede ser de cualquier tipo, tal como, por ejemplo, no humana, humanizada o completamente humana. Cuando la región variable de la cadena pesada de la región variable del anticuerpo es no humana (tal como, por ejemplo, de murino) y se combina de forma recombinante con una región Fc genomanipulada de acuerdo con esta divulgación, el anticuerpo recombinante resultante se denomina anticuerpo quimérico. Si la región variable de la cadena pesada del anticuerpo está humanizada y se combina de forma recombinante con una región Fc genomanipulada de acuerdo con esta divulgación, el anticuerpo recombinante resultante se denomina anticuerpo humanizado. Si la región variable de la cadena pesada del anticuerpo es humana y se combina de forma recombinante con una región Fc genomanipulada de acuerdo con esta divulgación, el anticuerpo recombinante resultante se denomina anticuerpo completamente humano. Por ejemplo, la región variable de la cadena pesada está humanizada e incluye regiones marco de origen humano y regiones determinantes de la complementariedad

(CDR) de origen no humano (en este caso, de murino). Debe entenderse que las regiones marco se pueden derivar de una fuente o más de una fuente y que las CDR se pueden derivar de una fuente o más de una fuente. Los expertos en la técnica conocen los procedimientos de humanización de anticuerpos y se conocen en la técnica.

- 5 **[0077]** La cadena ligera del anticuerpo puede ser humana, no humana o humanizada. En la realización que se muestra en la Figura 1B, la cadena ligera está humanizada e incluye regiones marco humanas, CDR no humanas (en este caso de murino) y una región constante humana. Debe entenderse que las regiones marco se pueden derivar de una fuente o más de una fuente y que las CDR se pueden derivar de una fuente o más de una fuente.
- 10 **[0078]** El anticuerpo que contiene la región Fc genomanipulada se selecciona basándose en su capacidad de unirse a una molécula superficial celular o a una molécula soluble que se une a una molécula superficial celular. De esta manera, por ejemplo, el anticuerpo se puede seleccionar basándose en su capacidad de unirse a las moléculas superficiales celulares tales como los receptores de citocina (por ejemplo, IL-2R, TNF-αR, IL-15R, etc.), moléculas de adhesión (por ejemplo, E-selectina, P-selectina, L-selectina, VCAM, ICAM, etc.), antígenos de diferenciación o
- 15 activación celular (por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD20, CD25, CD40, etc.), y otros. De forma alternativa, se puede seleccionar el anticuerpo basándose en su capacidad para unirse a una molécula soluble que se une a moléculas superficiales celulares. Dichas moléculas solubles incluyen, pero no se limitan a, citocinas y quimiocinas (por ejemplo, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, etc.) factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, PDGF, GCSF, HGF, IGF, BMP-1, etc.) moléculas que induce la diferenciación celular (por ejemplo, EPO, TPO, SCF; PTN, etc.), y
- 20 otros.
- [0079]** En general, la construcción de los anticuerpos dados a conocer en el presente documento se consigue mediante el uso de manipulaciones reconocidas utilizadas en tecnología de genomanipulación. Por ejemplo, se conocen generalmente en el campo las técnicas para aislar el ADN, preparar y seleccionar vectores para expresar el
- 25 ADN, purificar y analizar ácidos nucleicos, procedimientos específicos para preparar el ADN de un vector recombinante, escindir ADN con enzimas de restricción, unir ADN, introducir ADN incluyendo el ADN del vector en células hospedadoras por medios estables o transitorios, cultivar las células hospedadoras en medios selectivos o no selectivos para seleccionar y mantener células que expresan el ADN
- 30 **[0080]** Los anticuerpos monoclonales dados a conocer en el presente documento se pueden derivar utilizando el procedimiento del hibridoma, que se conoce en la técnica, u otros procedimientos de ADN recombinante bien conocidos en la materia. En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado se inmuniza con ADN, péptidos o proteínas que estimulan la producción de anticuerpos por los linfocitos.
- 35 **[0081]** De forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro. Los linfocitos producidos en respuesta al antígeno se fusionan a continuación con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Las células de hibridoma se siembran a continuación y se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parenteral no fusionadas. Las células de mieloma
- 40 preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, apoyan la producción estable de anticuerpos mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y no son sensibles a un medio tal como el medio HAT (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., N° de catálogo H-0262).
- [0082]** Se pueden usar también los anticuerpos que contienen la región Fc genomanipulada como composiciones
- 45 administradas por separado proporcionadas junto con agentes terapéuticos. A fines diagnósticos, los anticuerpos pueden tanto marcarse como no marcarse.
- [0083]** Se pueden usar anticuerpos no marcados en combinación con otros anticuerpos marcados (anticuerpos segundos) que reaccionan con el anticuerpo genomanipulado, tal como anticuerpos específicos de las regiones
- 50 constantes de la inmunoglobulina humana. De forma alternativa, los anticuerpos se pueden marcar directamente. Se puede emplear una amplia variedad de marcas, tales como radionucleidos, flúores, enzimas, sustratos de enzimas, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, ligandos (particularmente haptenos), etc. Están disponibles numerosos tipos de inmunoensayos y son bien conocidos por los expertos en la técnica.
- 55 **[0084]** De acuerdo con una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para producir la proteína de fusión, cuyo procedimiento comprende: (i) introducir una molécula de ADN que codifica la proteína de fusión en una célula hospedadora de mamífero, (ii) hacer crecer la célula en condiciones para que la proteína de fusión se exprese en su medio de crecimiento; y (iii) cosechar la proteína de fusión producida.

[0085] En otra realización a modo de ejemplo, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de fusión o una molécula de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo descrito anteriormente. Se proporciona también un procedimiento para tratar o evitar determinados síntomas administrando la composición farmacéutica. Por ejemplo, se proporciona un procedimiento, que (i) reduce los síntomas de/evita/trata una enfermedad autoinmune ($\square$) inhibe el rechazo de un injerto, (O) trata/evita el shock inducido por una endotoxina, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de la Fc híbrida y una proteína p40 o sus variantes/fragmentos.

[0086] La composición puede comprender un vehículo farmacéutico, un vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia no tóxica compatible para la administración de los anticuerpos al paciente. Pueden estar incluidos en el vehículo agua estéril, alcohol, grasas, ceras, y sólidos inertes. Los adyuvantes farmacéuticamente aceptados (agentes tamponantes, agente dispersante) pueden incorporarse también a la composición farmacéutica.

[0087] Se pueden administrar las composiciones de anticuerpos a un sujeto de una variedad de formas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. La concentración de la proteína de fusión, el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, por ejemplo, desde menos de aproximadamente 0,5%, usualmente a o al menos aproximadamente 1% hasta como mucho 15 o 20% en peso y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de fluidos, las viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

[0088] La presente invención proporciona también una molécula de ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión, y un vector de expresión que transporta la molécula de ácido nucleico. Dicho ácido nucleico puede administrarse directamente a un sujeto que necesita un polipéptido codificado por el ácido nucleico. De forma alternativa, el polinucleótido se produce expresando el ácido nucleico en un medio y a continuación administrándose a un sujeto.

[0089] El término "péptido", "polipéptido" o "proteína" se refiere a moléculas de 2 a 40 aminoácidos, prefiriéndose moléculas de 3 a 20 aminoácidos y prefiriéndose más las de 6 a 15 aminoácidos. Pueden generarse de forma aleatoria péptidos a modo de ejemplo mediante cualquier de los procedimientos citados anteriormente, llevados a cabo en una biblioteca de péptidos (por ejemplo, una biblioteca de expresión en fagos) o derivados mediante digestión de proteínas.

[0090] El término "fármaco", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que muestra actividad terapéutica cuando se administra a seres humanos o animales, y los ejemplos del fármaco incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, compuestos, extractos y ácidos nucleicos. Se prefiere un fármaco de polipéptido.

[0091] Los términos "polipéptido fisiológicamente activo", "molécula biológicamente activa", "proteína fisiológicamente activa", "polipéptido activo", "fármaco de polipéptido", y "fármaco de proteína", tal como se usan en el presente documento, tienen un significado indistinto, y se caracterizan en que están en una forma fisiológicamente activa presentando diversas funciones fisiológicas *in vivo*.

[0092] El fármaco de polipéptido tiene la desventaja de ser incapaz de mantener la acción fisiológica durante un largo periodo de tiempo debido a su propiedad de desnaturalizarse o degradarse fácilmente por las enzimas proteolíticas presentes en el cuerpo. Sin embargo, cuando el fármaco de polipéptido se une (o se acopla) a los fragmentos Fc de la inmunoglobulina de acuerdo con las realizaciones de la presente invención para formar una proteína de fusión, el fármaco tiene una mayor estabilidad estructural y vida media en suero. También, el polipéptido unido al fragmento de Fc tiene una disminución mucho más pequeña en la actividad fisiológica que otras formulaciones de fármacos de polipéptido conocidas. Por tanto, en comparación con la biodisponibilidad *in vivo* de los fármacos de los polipéptidos convencionales, el polipéptido fusionado que comprende el fármaco de polipéptido y el fragmento de Fc, o un conjugado del fármaco de polipéptido y del fragmento de Fc de acuerdo con la presente invención se caracteriza por tener una biodisponibilidad *in vivo* marcadamente mejorada. Esto se describe también claramente a lo largo de las realizaciones de la presente invención. Esto es, cuando se unen al fragmento de Fc de la presente invención, el receptor de IFN- α , G-CSF, EPO, p40, TNF, y otros fármacos de proteínas presentaron un aumento en la biodisponibilidad *in vivo* en comparación con sus formas naturales u otras formas fusionadas.

convencionales.

[0093] Debe entenderse que la presente invención aprovecha metodologías de ADN recombinante para generar las proteínas de fusión de Fc, los anticuerpos que contienen la región Fc genomanipulada de acuerdo con la presente invención y los fragmentos de anticuerpos útiles en la práctica de la invención. Las construcciones de fusión de Fc, se generan preferiblemente para el ADN, y los ADN resultantes se integran en vectores de expresión, y se expresan para producir las proteínas de fusión, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la invención.

[0094] Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término “vector” significa cualquier ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos competente para incorporarse en una célula hospedadora y que se va a recombinar con y a integrarse en el genoma de la célula hospedadora, o a replicarse de forma autónoma como un episoma. Dichos vectores incluyen ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fagémidos, cósmidos, vectores de ARN, vectores víricos y similares. Los ejemplos no limitantes de un vector vírico incluyen un retrovirus, un adenovirus, y un virus adenoasociado. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que los términos “expresión génica” o “expresión” de una proteína diana, significan la transcripción de una secuencia de ADN, traducción del transcrito de ARNm, y secreción de un producto de proteína de fusión de Fc o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0095] Un vector de expresión útil es RcCMV (Invitrogen, Carlsbad) o sus variantes. El vector de expresión útil debe transportar el promotor de citomegalovirus humano (CMV) para promover la transcripción constitutiva del gen de interés en células de mamífero y transportar la secuencia señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino para aumentar el nivel del ARN en estado estacionario después de la transcripción. En una realización de la presente invención, el vector de expresión es pAD11, que es un vector modificado de RcCMV. Los ejemplos del vector de expresión que transporta una secuencia de nucleótidos que codifica un fármaco de una molécula biológicamente activa puede incluir, y no se limita a, pAD 11 EPO-hFc-1, pAD 11 G-CSF-hFc-1, pAD 11 p40N303Q-hFc-1, pAD11 EPOhFc-6, pAD11 G-CSF-hFc-6, pAD11 p40N303Q-hFc-6, pAD11 EPO-hFc-5, pAD11 G-CSF-hFc-5, pAD11 p40N303QhFc-5 o pAD 11 TNFR-hFc-5, tal como se describe con más detalle en los Ejemplos.

[0096] Una célula hospedadora adecuada puede ser un transformador transfectado con la secuencia de ADN de la invención, y utilizarse para la expresión y/o la secreción de la proteína diana. Las células hospedadoras actualmente preferidas para uso en la invención incluyen células de hibridoma immortalizadas, células de mieloma NS/O, células 293, células de ovario de hámster chino, células HeLa, y células COS.

[0097] Un sistema de expresión que se ha usado para producir una expresión de alto nivel de las proteínas de fusión o el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo en las células de mamífero es una construcción de ADN que codifica, en la dirección 5' a 3', un casete de secreción, que incluye una secuencia señal y una región Fc de la inmunoglobulina, y una proteína diana tal como el receptor de p40, EPO, G-CSF, TNF. Se han expresado de forma satisfactoria algunas proteínas diana en dicho sistema e incluyen, por ejemplo, IL2, CD26, Tat, Rev, OSF-2, ss; IG-H3, el receptor de IgE, PSMA, y gp120. Se dan a conocer estas construcciones de expresión en las Patentes de Estados Unidos N^{os} 5.541.087 y 5.726.044 de Lo y col.

[0098] Las proteínas de fusión o la molécula de anticuerpo o los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden incluir o no una secuencia señal cuando se expresan. Tal como se usa en el presente invención, se entiende que el término “secuencia señal” significa un segmento que dirige la secreción del fármaco de la molécula biológicamente activa; la proteína de fusión, y posteriormente se escinde tras la traducción en la célula hospedadora. La secuencia señal de la invención es un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácido que inicia el transporte de una proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico, por ejemplo, el anticuerpo 14.18 (Gillies y col., J. Immunol. Meth. 1989. 125: 191-202), las secuencias señal de la cadena pesada del anticuerpo, por ejemplo, las secuencias señal de la cadena pesada del anticuerpo, por ejemplo MOPC141 (Sakano y col., Nature 1980. 286: 676-683), y cualesquiera otras secuencias señal que se conozcan en la técnica (véase, por ejemplo, Watson y col., Nucleic Acids Research 1984. 12: 5145-5164).

[0099] Se han caracterizado bien en la técnica las secuencias señal y se sabe que contienen normalmente de 16 a 30 restos de aminoácidos, y pueden contener unos pocos más o menos restos de aminoácidos. Un péptido señal típico consta de tres regiones, una región del extremo N básica, una región hidrófoba central, y una región del extremo C más polar. La región hidrófoba central contiene 4 a 12 restos hidrófobos que se anclan al péptido señal a través de la bicapa de lípidos de la membrana durante el transporte del polipéptido nascente. Tras el inicio, el péptido señal se escinde normalmente en el interior de la luz del retículo endoplásmico por enzimas celulares conocidos como peptidasas señal. Los potenciales sitios de escisión del péptido señal siguen generalmente la regla

"(-3, -1). De esta manera, un péptido señal típico tiene pequeños restos de aminoácidos neutros en las posiciones -1 y -3 y carece de restos de prolina en esta región.

[0100] La peptidasa señal escindirá dicho péptido señal entre los aminoácidos -1 y +1. De esta manera, la secuencia señal se puede escindir a partir del término amino formado de la proteína de fusión durante la secreción. Esto da como resultado la secreción de una proteína de fusión de Fc consistente en la región de Fc de la inmunoglobulina y la proteína diana. Se proporciona una descripción detallada de las secuencias del péptido señal en von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14: 4683.

[0101] Como será evidente para un experto en la técnica, la adecuabilidad de una secuencia señal concreta para uso en el casete de secreción puede requerir alguna experimentación rutinaria.

[0102] Dicha experimentación incluirá determinar la capacidad de la secuencia señal para dirigir la secreción de una proteína de fusión de Fc y también una determinación de la configuración óptima, genómica o el ADNc, de la secuencia que se va a usar con el fin de conseguir una secreción eficaz de las proteínas de fusión de Fc. De forma adicional, una persona experta en la técnica es capaz de crear un péptido señal sintético siguiendo las reglas presentadas por von Heijne (1986), y ensayar la eficacia de dicha secuencia señal sintética mediante la experimentación rutinaria. Se puede denominar una secuencia señal como "péptido señal", "secuencia líder", o "péptido líder"

[0103] La fusión de la secuencia señal y la región Fc de la inmunoglobulina se denomina algunas veces casete de secreción. Un casete de secreción a modo de ejemplo útil en la práctica de la invención es un polinucleótido que codifica en una dirección 5' a 3', una secuencia señal de un gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina y una región Fcy1 del gen $\gamma 1$ de la inmunoglobulina humana. La región Fcy1 del gen Fcy1 de la inmunoglobulina incluye preferiblemente al menos una porción del dominio bisagra de la inmunoglobulina y al menos el dominio CH3, o de forma más preferible al menos una porción del dominio bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la "porción" de la región bisagra de la inmunoglobulina significa una porción de la bisagra de la inmunoglobulina que contiene al menos uno, preferiblemente dos restos de cisteína capaces de formar enlaces disulfuro entre cadenas. El ADN que codifica el casete de secreción puede estar en su configuración genómica o en su configuración de ADNc. En determinadas circunstancias, puede ser ventajoso producir la región Fc a partir de secuencias de la cadena pesada de la Fcy2 de la inmunoglobulina humana. Aunque las fusiones de Fc basadas en la inmunoglobulina humana comportan similitud en ratones, las fusiones de Fc basadas en las secuencias $\gamma 2$ pueden presentar una farmacocinética superior en seres humanos.

[0104] En otra realización, la secuencia de ADN que codifica un sitio de escisión proteolítica interpuesto entre el casete de secreción y la proteína diana. Un sitio de escisión proporciona la escisión proteolítica de la proteína de fusión codificada separando de esta manera el dominio Fc de la proteína diana. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que "sitio de escisión proteolítica" significa las secuencias de aminoácidos que se escinden preferentemente por una enzima proteolítica u otros agentes de escisión proteolítica. Los sitios de escisión proteolítica útiles incluyen secuencias de aminoácidos que se reconocen por las enzimas proteolíticas tales como tripsina, plasmina o enteroquinasa K. Se conocen muchas parejas de sitio de escisión/agente de escisión (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.726.044)

[0105] Además, sería también útil la sustitución o eliminación de las construcciones de estas regiones constantes, en las que uno o más restos de aminoácidos de los dominios de la región constante se sustituyen o eliminan. Un ejemplo sería introducir sustituciones de aminoácidos en la región CH2 superior para crear una variante de Fc con afinidad reducida por los receptores de Fc (Cole y col. (1997) *J. Immunol.* 159: 3613). Una persona normalmente experta en la técnica puede preparar dichas construcciones utilizando técnicas de biología molecular bien conocidas.

[0106] Los ejemplos no limitantes de fármacos de proteína capaces de conjugarse con el fragmento de Fc de la inmunoglobulina de la presente invención incluyen la hormona del crecimiento humano, la proteína-1 morfogenética del hueso (BMP-1), hormona liberadora de la hormona de crecimiento, péptido liberador de la hormona del crecimiento, interferones y receptores de interferones (por ejemplo, interferón α , β y γ , receptor del interferón de tipo I soluble en agua, etc.), factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), péptidos de tipo glucagón (por ejemplo, GLP-1, etc.), receptor acoplado a la proteína G, interleucinas (por ejemplo, interleucina 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, etc.) y los receptores de las interleucinas (por ejemplo, receptor de IL-1, receptor de IL-4, etc.), enzimas (por ejemplo, glucocerebrosidasa, iduronato-2-sulfatasa, alfa-galactosidasas-A, agalsidasa alfa y beta, alfa-L-iduronidasa, butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato decarboxilasa, imiglucerasa,

lipasa, uricasa, acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a interleucina y citocina (por ejemplo, IL-18pb, proteína de unión a TNF, etc.), factor activador de macrófagos, péptido macrófago, factor de linfocitos B, factor de linfocitos T, proteína A, inhibidor de alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfotóxica, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento metastásico, antitripsina alfa-1, albúmina, alfa-lactoalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina muy glicosilada, angiopoyetinas; hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de la trombina, trombosmodulina, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor XIII, factor activador del plasminógeno, péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de la renina, inhibidor de la collagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento del hueso, proteína estimuladora ósea, calcitonina, insulina, atriopéptida, factor inductor de cartilago, elcatonina, factor activador del tejido conectivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona estimuladora del folículo, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor 1 de la axogénesis, péptido natriurético del cerebro, factor neurotrófico derivado glial, netrina, factor inhibidor neurófilo, factor neurotrófico, neurturina, etc.), hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento de tipo insulina, hormona adenoarética, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de la gastrina, factor de liberación de la corticotropina, hormona estimuladora del tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores (por ejemplo, TNFRP75), TNFRP55), receptor de IL-1, receptor de VEGF, receptor del factor activador de linfocitos B, etc.), antagonistas de receptores (por ejemplo, IL1-Ra, etc.), antígenos superficiales celulares (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), antígenos de vacunas de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fd), y antígenos de vacuna derivados de virus. Un fragmento de anticuerpo puede ser Fab, Fab', F(ab')₂, Fd o scFv, que es capaz de unirse a un antígeno específico, y preferiblemente Fab'. Los fragmentos Fab contienen el dominio variable (VL) y el dominio constante (CL) de la cadena ligera y el dominio variable (VH) y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en términos de añadir algunos restos de aminoácidos que incluyen uno o más restos de cisteína procedentes de la región bisagra al extremo carboxilo del dominio CH1. Los fragmentos Fd comprenden solo el dominio VH y CH1, y los fragmentos F(ab')₂ se producen como una pareja de fragmentos Fab' tanto mediante enlace disulfuro como mediante reacción química. Los fragmentos scFv (Fv monocatenarios) comprenden los dominios VL y VH que se unen entre sí mediante un péptido enlazador y de esta manera están presentes en una cadena de un único péptido.

[0107] En particular, se prefieren como moléculas biológicamente activas aquellas que requieren una frecuente dosificación tras la administración en el cuerpo para la terapia o la prevención de enfermedades, que incluyen, la hormona del crecimiento humano, interferones (interferón α , β , γ , etc.) factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, eritropoyetina (EPO), receptor de TNF, p40, y fragmentos de anticuerpos. Además, se incluyen determinados derivados en el alcance de las moléculas biológicamente activas de la presente invención siempre que tengan función, estructura, actividad o estabilidad sustancialmente idéntica a o mejorada en comparación con otras formas naturales de las moléculas biológicamente activas. En la presente invención, el fármaco de polipéptido más preferible es el interferón alfa.

[0108] En otro aspecto de la invención, las proteínas de fusión IgG-Fc e IgG-CH, por ejemplo, se sintetizan como monómeros que pueden ensamblarse para formar dímeros. Normalmente, los dímeros se unen mediante enlaces disulfuro en la región bisagra de la IgG. Los medios acondicionados procedentes de células que secretan las proteínas de fusión de IgG pueden contener mezclas de monómeros y dímeros de la proteína de fusión de IgG. Para su uso como agentes terapéuticos humanos, será deseable utilizar poblaciones homogéneas tanto de monómeros como de dímeros de la proteína de fusión de IgG, pero no de las mezclas de las dos formas.

[0109] Se proporcionan también procedimientos para obtener preparaciones esencialmente puras de proteínas de fusión de IgG-polipéptido dímérico activo. Los procedimientos se llevan a cabo generalmente obteniendo una célula hospedadora capaz de expresar la proteína de fusión de IgG, recogiendo los medios acondicionados, y purificando la proteína de fusión dímica a partir de la proteína de fusión monomérica, los agregados y las proteínas contaminantes mediante procedimientos de cromatografía en columna. Las células hospedadoras adecuadas para expresar las proteínas de fusión de IgG incluyen células de levaduras, insectos, mamíferos u otras células eucariotas. En una realización, la célula hospedadora puede ser una célula de mamífero, particularmente células COS; CHO o BHK.

[0110] Se proporcionan también proteínas de fusión novedosas de un fármaco de polipéptido y un fragmento de Fc. En una realización, un fármaco de polipéptido tal como el receptor de EPO, p40, G-CSF o TNF se une

directamente al fragmento de Fc híbrido sin intervención de un enlazador peptídico. En otra realización, el fármaco de polipéptido se une a cada uno de los otros mediante un péptido enlazador de 1 a 50 aminoácidos, y, de forma más preferible mediante un enlazador peptídico de 1 a 7 aminoácidos. Los enlazadores particularmente útiles para este fin incluyen un péptido inmunológicamente inactivo compuesto por restos de Gly y Ser (por ejemplo, Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser SEQ ID NO: 32) o compuesto por aminoácidos en las posiciones 282-314 de la SEQ ID NO: 25, derivada de albúmina humana.

[0111] En el caso en que se utiliza un enlazador, el enlazador y el fármaco de polipéptido pueden prepararse en una determinada dirección. Esto es, el enlazador puede unirse en el extremo N, el extremo C o un grupo libre del fragmento de Fc híbrido, y puede también unirse en el extremo N, el extremo C o un grupo libre del fármaco de polipéptido. Cuando el enlazador es un enlazador peptídico, el enlace puede tener lugar en un sitio de unión determinado. Cuando un fármaco de polipéptido y un Fc híbrido se expresan de forma separada y a continuación se unen entre sí, el acoplamiento se puede llevar a cabo usando cualquiera de los numerosos agentes de acoplamiento conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de los agentes de acoplamiento incluyen 1,1-bis (diazacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida tales como ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres que incluyen ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (propionato de succinimidilo), y maleimidias funcionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano.

[0112] La presente invención proporciona también procedimientos para la producción de un fragmento de Fc-híbrido-fármaco de polipéptido.

[0113] La presente invención proporciona también procedimientos para tratar dolencias aliviadas mediante la administración de un fármaco de polipéptido. Estos procedimientos incluyen administrar a un mamífero que tiene la dolencia, que puede estar o no directamente relacionada con la enfermedad de interés, una cantidad eficaz de un polipéptido de la invención. Por ejemplo, se puede administrar a un sujeto, preferentemente un mamífero, un ácido nucleico, tal como un ADN o ARN, que codifica una proteína de fusión de un fragmento de Fc híbrido-fármaco de polipéptido deseado, como agente terapéutico. Dicho polipéptido quimérico se puede administrar por vía intravenosa, subcutánea, oral, bucal, sublingual, nasal, parenteral, rectal, vaginal o mediante una ruta pulmonar.

[0114] Una proteína de fusión de EPO (incluyendo sus variantes/fragmentos)-fc de la presente invención puede ser útil para aumentar y mantener el hematocrito en un mamífero.

[0115] p40 es una subunidad de IL-12. IL-12 es una citocina heterodimérica de 75 kDa que tiene algunas funciones in vivo. Por ejemplo, IL-12 estimula la proliferación de linfocitos T y células NK activados y promueve las respuestas del linfocito auxiliar de tipo Th 1. IL-12 ejerce sus efectos biológicos mediante la unión del receptor de IL-12 a la membrana plasmática de los linfocitos T y las células NK activados, y la capacidad de IL-12 de unirse al receptor IL-12 se ha atribuido a la subunidad p40 de IL-12. Por tanto, una proteína de fusión de p40 (incluyendo sus variantes/fragmentos)-fc de la presente invención puede ser útil para reducir los síntomas de/evitar/tratar una enfermedad autoinmune, (□) inhibir el rechazo de un injerto, o (□) tratar/evitar el shock inducido por una endotoxina. También una proteína de fusión de p40 (incluyendo sus variantes/fragmentos)-fc de la presente invención puede ser útil en el tratamiento/prevenimiento/mejora de los síntomas de la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple o psoriasis. Se conocen en la técnica variantes y fragmentos, incluyendo, pero sin limitarse a, el documento WO 97/20062. Una realización de la variante p40 incluye, pero no se limita a, p40 que contiene la sustitución Asn303Gln.

[0116] El factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) es una proteína que es esencial para la proliferación y diferenciación de los granulocitos, particularmente los neutrófilos. Los granulocitos engullen y devoran invasores microbianos y desechos celulares y de esta manera son cruciales para la respuesta a la infección. La quimioterapia destruye los granulocitos y/o disminuye la producción de granulocitos. Por tanto, una proteína de fusión G-CSF (incluyendo sus variantes/fragmentos)-fc de la presente invención puede ser útil en el tratamiento/prevenimiento/mejora de los síntomas de la mielosupresión de la neutropenia inducida por quimioterapia tras el trasplante de médula ósea, leucemia aguda, anemia aplásica, síndrome mielodisplásico, neutropenias crónicas graves, o movilización de las células progenitoras de la sangre periférica para el trasplante.

[0117] Las proteínas de fusión de la invención no solo son útiles como agentes terapéuticos, sino como un experto en la técnica reconoce, las proteínas de fusión son útiles en la producción de anticuerpos para uso diagnóstico. Igualmente, la administración adecuada del ADN o ARN, por ejemplo, en un vector u otro sistema de administración para dichos usos, está incluida en los procedimientos de uso de la invención.

[0118] Las composiciones de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier ruta que sea compatible con las moléculas concretas. Se contempla que las composiciones de la presente invención se proporcionan a un animal mediante cualquier medio adecuado, en forma directa (por ejemplo, por vía local, como mediante inyección, implante o administración tópica a un locus en un tejido) o por vía sistémica (por ejemplo, por vía parenteral u oral). Cuando la composición es para proporcionar por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, subcutánea, oftálmica, intraperitoneal, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intranasal o mediante administración en aerosol, la composición incluye preferiblemente parte de una suspensión o disolución fluida acuosa o fisiológicamente compatible. De esta manera, el portador o vehículo es fisiológicamente aceptable de tal manera que, además de administrar la composición deseada al paciente, no afecta de forma adversa de otra forma al electrolito y/o al equilibrio volumétrico del paciente. El medio fluido para el agente puede incluir de esta manera solución salina fisiológica normal.

[0119] Las construcciones de ADN (o construcciones génicas) de la invención se pueden usar también como parte de un protocolo de terapia génica para administrar los ácidos nucleicos que codifican un fármaco de polipéptido o una construcción de una proteína de fusión del mismo.

[0120] La invención se caracteriza por vectores de expresión para la transfección y la expresión in vivo de un fármaco de polipéptido de interés o una construcción de una proteína de fusión del mismo en tipos de células concretos con el fin de reconstruir o suplementar la función del fármaco de polipéptido deseado. Se pueden administrar construcciones de expresión del fármaco de polipéptido deseado, o construcciones de la proteína de fusión del mismo, en cualquier vehículo biológicamente eficaz, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de administrar eficazmente el gen que codifica el fármaco de polipéptido deseado o la construcción de la proteína de fusión del mismo a las células in vivo.

[0121] Las soluciones incluyen la inserción del gen sujeto en vectores víricos que incluyen retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, y el virus 1 del herpes simple recombinantes, o en bacterias recombinantes o plásmidos eucariotas. Las dosificaciones preferidas para la administración de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas están comprendidas en el intervalo de 0,1 mg – 100 mg para seres humanos, de forma más preferible 1 mg – 10 mg, y lo más preferible 2 mg 10 mg. Se contempla que la dosificación óptima y el modo de administración se pueden determinar mediante experimentación rutinaria bien comprendida en los conocimientos del experto en la técnica.

[0122] Las dosificaciones preferidas de la proteína de fusión para la administración están comprendidas en el intervalo de 0,1 mg – 1.000 mg para seres humanos, de forma más preferible, 1 mg -100 mg, y lo más preferible 5 mg – 20 mg. Se contempla que la dosificación óptima, sin embargo, dependa también de la enfermedad que se está tratando y de la existencia de efectos secundarios. Sin embargo, se pueden determinar las dosificaciones óptimas utilizando experimentación rutinaria. La administración de la proteína puede ser mediante inyecciones en bolo periódicas, o mediante administración intravenosa, subcutánea, o intraperitoneal continua desde un depósito externo (por ejemplo, desde una bolsa intravenosa) o interna (por ejemplo, a partir de un implante bioerosionable).

[0123] Además, se contempla que las proteínas de fusión de la invención se pueden administrar también a receptor previsto junto con una pluralidad de diferentes moléculas biológicamente activas. Se contempla, sin embargo, que la combinación óptima de la proteína de fusión y otras moléculas, modos de administración, y dosificaciones se puede determinar mediante experimentación rutinaria bien comprendida dentro del nivel de conocimientos del experto en la técnica.

Modo para realizar la invención

[0124] La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos no limitantes

[0125] <Ejemplo 1> Preparación de vectores de expresión para las proteínas de fusión hFc-1, hFc-2, hFc-3, hFc-4, hFc-5, y hFc-6

[0126] La hFc-1 incluye 9 aminoácidos (90-98) de la región CH1 de la IgG del extremo C, la región bisagra (99-113) de IgG1, 6 aminoácidos (111-116) de la región CH2 de la IgG2 del extremo N, 103 aminoácidos (118-220) de la región CH2 de la IgG4, y 107 aminoácidos (221-327) de la región CH3 de la IgG4 (Fig. 1 y 2). Se muestra en la SEQ ID NO: 18 una secuencia de aminoácidos de la hFc-1. Para obtener nucleótidos optimizados por el codón que codifican, cada uno de ellos, la hFc-1 (SEQ ID NO:1), la EPO humana (SEQ ID NO: 7), el G-CSF humano (SEQ ID NO: 8) y la p40N303Q humana (un mutante derivado de la sustitución de Asn con Gln en el 303^{er} aminoácido de la

subunidad p40 humana) (se muestra una secuencia de nucleótidos de p40N303Q como la SEQ ID NO:9, y se muestra una secuencia de aminoácidos de la p40 humana como la SEQ ID NO: 17), respectivamente, estas moléculas de nucleótidos se sintetizaron mediante un servicio personalizados de TOP Gene Technologies (Quebec, Canadá) (www.topgenetech.com). Para aumentar el nivel de expresión de la proteína, resulta de mucha utilidad optimizar la utilización del codón del gen. El modelo de utilización del codón difiere entre organismos. Algunos codones se utilizan con más frecuencia en un organismo, pero se usan raramente en otro organismo. El sesgo en la utilización del codón se ha atribuido a la eficacia de la traducción, la capacidad del organismo para sintetizar la proteína codificada. Para insertar cada gen de fusión en un vector de expresión, pAD11 (SEQ ID NO: 10), se generó un sitio EcoRI en el extremo 5' de la secuencia ATG de la EPO, G-CSF, y p40N303Q y se generó un sitio Xba en el extremo 3' del codón de terminación de hFc-1. El vector de expresión pAD 11 se obtuvo de la estructura de RccMV (disponible de Invitrogen, Carlsbad). pAD11 incluye un promotor derivado de citomegalovirus (CMV), secuencias poli (A) derivadas de la hormona de crecimiento bovino, secuencia de intervención de la globina (gIVS) derivada de la beta globina de conejo (Mol Cell Biol, 1988 8: 4395) y etc. Para preparar el vector pAD11, existen algunas modificaciones a partir del vector RccMV (Invitrogen). Se eliminó una región resistente a la neomicina mediante tratamiento con la enzima Xho I y se añadió gIVS a 3' de la región del promotor de CMV. Además, se añadió un gen de la dihidrofolato reductasa de ratón (DHFR, Pubmed, NM 010049) a 5' del promotor de CMV. El vector pAD11 se desarrolló después de muchas pruebas de expresión en combinación con algunos elementos descritos anteriormente. El resultado no publicado de los autores, el vector pAD11 mostró un aumento de aproximadamente 12 veces en el nivel de expresión, en comparación con el vector RccMV (Invitrogen). Para preparar un sitio de unión entre el extremo 3' de EPO, G-CSF y p40N303Q en el extremo 5' de hFc-1 en el marco, se generó un sitio Nhe I en el extremo 3' de la secuencia de codificación de EPO, G-CSF y p40N303Q y en el extremo 5' de la secuencia de codificación de hFc-1. Tras subclonar mediante cada uno de los sitios de las enzimas de restricción, se generaron los vectores de expresión finales de la hFc-1 fusionada con EFO, G-CSF o p40N303Q, que se designaron posteriormente como pAD11 EPO-hFc-1, pAD11 G-CSF-hFc-1 y pAD11 p40N303Q-hFc-1, respectivamente.

[0127] Se muestran las secuencias de los aminoácidos de hFc-2, hFc-3, hFc-4, hFc-5 y hFc-6 en las SEQ ID NOs: 19-23, respectivamente. La hFc-6 incluye 9 aminoácidos (90-98) del dominio CH1 de la IgD del extremo C, 64 aminoácidos de la región bisagra (99-162) de IgD, 8 aminoácidos (shtqplgv 163-170) del dominio CH2 de la IgD del extremo N, 100 aminoácidos (121-220) del dominio CH2 de la IgG4, y 107 aminoácidos (221-327) del dominio CH3 de la IgG4 (Fig. 1 y 2). Para obtener moléculas de nucleótidos optimizadas por el codón que codifiquen la hFc-6 (SEQ ID NO:6, se sintetizó el gen mediante el servicio personalizado de TOP Gene Technologies (www.topgenetech.com). Para hacer una fusión entre el extremo 3' de EPO, G-CSF, o p40N303Q y el extremo 5' de hFc-6 en marco, se usó un sitio Nhe I (gctagc: Ala-Ser) incluido en la región del extremo N (90 y 91 aminoácidos) de hFc-6. También, para insertar cada gen de la fusión hFc-6 en un vector pAD 11, se generó el sitio Xba en el extremo 3' del gen hFc-6. Tras subclonar utilizando cada sitio de las enzimas de restricción, se generaron los vectores de expresión final de la EPO fusionada con hFc-6, G-CSF y p40N303Q, que se designaron a continuación como pAD11 EFO-hFc-6, pAD11 G-CSF-hFc-6 y pAD11 p40N303QhFc-6, respectivamente. Las hFc-2, hFc-3, hFc-4, y hFc-5 tienen regiones CH2 y CH3 idénticas, pero tienen diferentes tamaños de la bisagra de IgD (Figs. 1 y 2). La hFc-2 (SEQ ID NO: 19), hFc-3 (SEQ ID NO: 20), hFc-4 (SEQ ID NO: 21), y hFc-5 (SEQ ID NO: 22) incluye 5 aminoácidos (158-162), 10 aminoácidos (153-162), 20 aminoácidos (143-162), 30 aminoácidos (133-162) de la bisagra de la IgD del extremo C, respectivamente (Fig.1 y 2). Para llevar a cabo la fusión de los genes entre EPO, G-CSF, p40N303Q o TNFR (receptor II del factor de necrosis tumoral) (SEQ ID NO: 30) y las moléculas de ácido nucleico de las moléculas que codifican estas hFc (SEQ ID NOs: 2-5), se sintetizaron los fragmentos génicos mínimos en el tamaño total de los genes fusionados mediante el servicio personalizado de TOP Gene Technologies (www.topgenetech.com). Los fragmentos sintetizados de cada EPO, G-CSF, p40N303Q o TNFR fusionados con una molécula de nucleótido que codifica la bisagra y la región CH2 del extremo N de cada hFc-2, hFc-3, hFc-4, o hFc-5 incluyen las secuencias incluidas entre las secuencias completas de EPO, G-CSF, p40N303Q o TNFR del sitio idéntico de la enzima, el sitio BstE II (GGTGACC) que está localizado en los restos de aminoácidos 138-140° de la región CH2 en IgG4 (SEQ ID NO: 13). Los vectores de subclonación incluyendo algunos fragmentos génicos se extrajeron con EcoR I y BstE II localizados en el extremo 5' y el extremo 3', respectivamente, y a continuación se unieron a la región CH2-CH3 de la hFc-6. Finalmente, cada gen de fusión se subclonó en el pAD11 utilizando los sitios EcoR I y Xba, y a continuación se designaron como pAD11 EPO-hFc-2, pAD11 EPO-hFc-3, pAD11 EPO-hFc-4, pAD11 EPO-hFc-5, pAD11 G-CSF-hFc-2, pAD11 G-CSF-hFc-3, pAD11 G-CSF-hFc-4, pAD11 G-CSF-hFc-5, pAD11 p40N303Q-hFc-2, pAD11 p40N303Q-hFc-3, pAD11 p40N303Q-hFc-4, pAD11 p40N303Q-hFc-5 and pAD11 TNFR-hFc-5, respectivamente.

[0128] <Ejemplo 2> preparación de los vectores de expresión de thFc-1 y thFc-2 acoplados a IFN-b

[0129] La thFc-1 incluye 23 aminoácidos (MDAMLRGLCCVLLLCGAVFVSPS) de la secuencia señal del activador

del plasminógeno del tejido humano (tPA), 15 aminoácidos (99-113) de la región bisagra de IgG1, 6 aminoácidos (111-116) de la región CH2 de la IgG2 del extremo N, 103 aminoácidos (118-220) de la región CH2 de oflgG4, y 107 aminoácidos (221-327) de la región CH3 de IgG4 (Fig. 3). Se muestra una secuencia de aminoácidos de thFc-1 en la SEQ ID NO: 28. La thFc-2 incluye 23 aminoácidos (MDAMLRGLCCVLLCGAVFVSPS) de la secuencia señal de tPA, 15 aminoácidos (148-162) de la región bisagra de la IgD, 8 aminoácidos (163-170) de la región CH2 de la IgD del extremo N, 100 aminoácidos (121-220) de la región CH2 de la IgG4, y 107 aminoácidos (221-327) de la región CH3 de IgG4 (Fig. 3). Se muestra una secuencia de aminoácidos de thFc-2 en la SEQ ID NO: 29. Para obtener los nucleótidos optimizados por el codón que codifican thFc-1 (SEQ ID NO: 26) o thFc-2 (SEQ ID NO: 27) acoplados al extremo N del IFN-beta humano con la secuencia señal eliminada, se sintetizaron estas moléculas de nucleótidos mediante el servicio personalizado de TOP Gene Technologies (Quebec, Canadá) (www.topenetech.com). Para insertar cada gen de fusión en un vector de expresión, pAD11 (SEQ ID NO: 10), se generó un sitio EcoR I en el extremo 5' de thFc-1 o thFc-2 y se generó un sitio Not I en el extremo 3' del codón de terminación de IFN-beta. Tras subclonar utilizando cada sitio de las enzimas de restricción, se designaron los vectores de expresión final como pAD11 thFc-1-AL(0)-IFN-beta y pAD11 thFc-2-AL(0)-IFN-beta, respectivamente.

[0130] Para acoplar thFc a IFN-beta mediante enlazadores de albúmina de diferentes tamaños o el enlazador Gly-Ser, los fragmentos génicos desde el sitio Pst I de la región CH3 de thFc-1 acoplado a IFN-beta cuya secuencia señal se había eliminado mediante enlazadores de albúmina de diferentes tamaños (3aa, 8aa, 13aa, 18aa, 23aa y 33aa) o el enlazador Gly-Ser, fueron sintetizados por el servicio de atención al cliente de TOP Gene Technologies (www.topgenetech.com) (Fig. 4). Para insertar 7 diferentes fragmentos génicos en los vectores de expresión, pAD11 thFc-1-AL(0)-IFN-beta y pAD11 thFc-2-AL(0)-IFN-beta, se generó un sitio Pst I en el extremo 5 de los mismos y se generó un sitio Not I en el extremo 3 del codón de terminación de IFN-beta. Tras subclonar utilizando cada sitio de las enzimas de restricción, se designaron los vectores de expresión final como pAD11 thFc-1-AL(1)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-AL(2)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-AL(3)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-AL(4)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-AL(5)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-AL(6)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-GS-IFN-beta, y pAD11 thFc-2-AL(1)-IFN-beta, pAD11 thFc-2-AL(2)-IFN-beta, pAD11 thFc-2-AL(3)-IFN-beta, pAD11 thFc-2-AL(4)-IFN-beta, pAD11 thFc-2-AL(5)-IFN-beta, pAD11 thFc-2-AL(6)-IFN-beta, pAD11, y thFc-2-GS-IFN-beta, respectivamente.

[0131] <Ejemplo 3> Expresión de las proteínas EPO-hFc humanas, G-CSF-hFc humanas, p40N303Q-hFc humanas, TNFR-hFc-5 y thFc-IFN-beta humanas

[0132] Se usaron células COS-7 para el ensayo de la expresión con medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Hyclone, South Logan) y antibióticos (Invitrogen, Carlsbad). Se transfectoron los vectores que codificaban EPO-hFc, G-CSF-hFc, p40N303Q-hFc, TNFR-hFc-5, thFc-IFN-beta en 5 X 10⁶ células COS-7 utilizando procedimientos de electroporación convencionales. A las 48 h de la transfección, se cosecharon los sobrenadantes y las células. Para comprobar la expresión de la proteína de fusión de cada vector, se utilizaron todas las muestras para el ensayo ELISA con varios Kits (R&D system, Minneapolis, n° DEP00 para EPO; Biosource, Camarillo, n° KHC2032, para G-CSF; R&D system, Minneapolis, n° DY1240 para p40N303Q de R&D System, Minneapolis, n° DRT200 para TNFR, PBL Biomedical Laboratories, n° 41410-1A para IFN-beta) y el análisis de la transferencia western con anticuerpos dirigidos contra la IgG humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz). Como resultado, todos los vectores mostraron un modelo correcto de expresión en los sobrenadantes y los lisados celulares (no se muestran los datos)

[0133] <Ejemplo 4> Purificación de proteínas fusionadas a hFc

[0134] Se cultivaron células CHO/DHFR⁻ (células de ovario de hámster chino, DG44, ATCC) con a-MEM (Invitrogen, Carlsbad), suero bovino fetal dializado al 10% (JRH Biosciences, Kansas), suplemento de HT (Invitrogen, Carlsbad) y antibióticos (Invitrogen, Carlsbad). Los vectores de expresión se transfectoron en células CHO de acuerdo con los procedimientos de precipitación simultánea de CaPO₄ convencionales. A las 48 h de la transfección, las células CHO se desprendieron de las placas y se diluyeron varias veces (1/2, 1/5, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500). Las células diluidas se plaquearon en placas de 100 mm y se cultivaron con los medios sin el suplemento de HT. Durante el procedimiento de cribado, se suministraron medios recientes sin el suplemento de HT a las células sin pases. Se generaron colonias durante 2-3 semanas después del plaqueo y se movieron las colonias individuales a placas de 48 pocillos. Se cribaron las colonias positivas tras el ensayo ELISA para las detecciones de la EPO, G-CSF, p40N303Q, y TNFR. Cada colonia que mostró la expresión más elevada se cultivó a gran escala (5 l) usando medio exento de suero (JRH Biosciences, Kansas). Los sobrenadantes exentos de suero cosechados se usaron para la purificación de cada proteína de fusión. Para la purificación, columnas FF de proteína A recombinante de HiTrap (Amersham Biosciences, Piscataway) se equilibraron con fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0). Se añadieron los sobrenadantes filtrados a las columnas y se eluyeron con citrato de sodio 0,1 M (pH 3,0). Se obtuvieron

finalmente las proteínas eluidas tras diálisis con membrana (MWCO 12 14K, Spectrapor, Rancho Dominguez) más de tres veces. Se determinaron todas las concentraciones de las muestras de proteínas mediante el kit BCA (Pierce Biotechnology, Rockford) para la medida de la proteína total y mediante kits ELISA para la medida de las EFO-hFc, G-CSF-hFc, p40N303Q-hFc, TNFR-hFc-5 y thFc-IFN-beta.

5

[0135] <Ejemplo 5> Ensayo de unión a FcgRI y C1q

[0136] Para investigar si las proteínas fusionadas a hFc-5 se unen a FcgRI y C1q, Mabthera (Rituximab, Roche), hlgG1 (Calbiochem, nº de Cat. 400120), Enbrel® (etanercept, Amgen), EPO-hFc-5, G-CSF-hFc-5 y p40N303Q-hFc-5 se diluyeron en serie (de 2 µg/ml a 16 ng/ml en 2 veces) y se revistieron en una tira de 8 pocillos (COSTAR, Nueva York) durante la noche en 4. Para preparar una curva estándar, se diluyeron en serie también FcgRI (R&D, nº de Cat BAF1257) o Clq (AbD serotech, nº de Cat 2221-5504) (de 2 µg/ml a 32 ng/ml en 2 veces) y se revistieron en una tira de 8 pocillos (COSTAR, Nueva York) durante la noche en 4. Tras lavar cada tira de muestras con tampón de lavado (PBS que contenía Tween al 0,05%) y bloquear con FBS al 10% en PBS durante una hora a TA, se añadieron FcgRI o C1q en cada pocillo a 2 µg/ml tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente (TA). Se lavaron todas las tiras con tampón de lavado. Para el ensayo de unión a C1q, se añadió un anticuerpo dirigido contra C1q conjugado con HRP (AbD serotech, nº de cat. 2221-5004P) en cada pocillo a 2,5 µg/ml después de 30 min de incubación a TA en condiciones de oscuridad. Para el ensayo de unión a FcgRI, se añadió un anticuerpo biotinilado dirigido contra FcgRI (R&D, nº de cat. 1257-FC) en cada pocillo a 2 µg/ml tras 1 hora de incubación a TA. Tras lavado con tampón de lavado, se añadió Estreptavidina-HRP (BD, nº de cat. 554066) diluida 3.000 veces a cada tira tras una incubación de 30 minutos a TA en condiciones de oscuridad. Tras el lavado de las tiras, se añadió solución de TMB (mezcla 1:1 de sustrato de peroxidasa TMB y solución B de sustrato de peroxidasa, KPL, nº de Cat. 50-76-01, nº de Cat. 50-65-00) para el revelado y se añadió H₂SO₄ 2 N para detener el revelado. Tal como se muestra en la Fig. 6(a) y en la Fig. 6(b), MabThera®, Enbrel® e hlgG1 mostraron una buena unión a FcgRI y Clq, pero EPO-hFc-5, G-CSF-hFc-5 y p40N303Q-hFc-5 no.

[0137] <Ejemplo 6> Bioactividad *in vitro* de proteínas fusionadas a hFc purificadas

[0138] Para investigar las bioactividades *in vitro* de las proteínas EPO-hFc, se cultivó la línea de células F35E humana en medio RPMI1640 (Cambrex, Charles City) suplementada con FBS al 10%, antibióticos y 5 UI/ml de EPO humana recombinante (DongA, República de Corea). Se configuraron los bioensayos sembrando 2 X 10⁴ células en los pocillos de ensayo de una placa de cultivo de 96 pocillos (Corning, Países Bajos). Se añadieron las muestras con diluciones en serie (0, 0,064 mUI/ml a 25 UI/ml en 5 veces) de EPO, EPO-hFc-1, EPO-hFc-5, EPO-hFc-6, EPO-IgG1 Fc o Aranesp (darbepoetina alfa, Amgen), a estos pocillos y se incubaron las placas a 37° C durante 72 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. De acuerdo con el protocolo del fabricante, se llevó a cabo el ensayo MTT utilizando un kit de ensayo colorimétrico de crecimiento celular (Sigma-Aldrich, Corea). La línea de células F35E humana mostró una fuerte respuesta proliferativa a rEPO, tal como se evidenció de una manera dependiente de la dosis en numerosas células y valores de absorbancia. Tal como se muestra en la Fig. 7(a) Aranesp® y las proteínas EPO acopladas a IgG1 Fc o las hFc mostraron pérdida de actividad biológica en comparación con la proteína EPO. Sin embargo, EPO-hFc-1, EPO-hFc-5 y EPO-hFc-6 mostraron una bioactividad significativamente mayor que EPO-IgG1 Fc. Además, EPO-hFc-5 y EPO-hFc-6 mostraron una bioactividad ligeramente mayor que Aranesp® indicando que estas proteínas fusionadas a hFc parecen ser mejores que Aranesp® en términos de mantener la bioactividad de la proteína EPO.

[0139] Para investigar las bioactividades *in vitro* de la proteína G-CSF-hFc, se cultivó una línea de células hematopoyéticas de ratón, NF-60 en medio RPMI1640 (Cambrex, Charles City) suplementado con FBS al 10%, antibióticos, y 100 unidades/ml de IL-3 recombinante de ratón (R&D system, Minneapolis). Se configuraron los bioensayos sembrando 2 X 10⁴ células en los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos (Corning, Países Bajos). Las muestras con diluciones en serie (que variaban desde 0 a 10.000 pg/ml en 3 veces) de G-CSF-hFc-5 y Neulasta (pegfilgrastim, Amgen) se añadieron a estas células y se incubaron las placas a 37° C durante 72 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. Se evaluaron las muestras de proteína en pocillos por triplicado y este experimento se llevó a cabo repetidamente durante cinco veces. A las 72 horas de la incubación, se llevó a cabo el ensayo MTT utilizando un kit de ensayo colorimétrico de crecimiento celular (Sigma-Aldrich, Corea), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tal como se ilustra en la Fig. 7(b), GCSF-hFc-5 mostró una bioactividad ligeramente superior en la *in vitro* que Neulasta®.

[0140] Para investigar la bioactividad *in vitro* de la proteína p40N303Q-hFc, se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con artritis reumatoide con 2 µg/ml de anticuerpo dirigido contra CD3 humana (R&D system, nº MAB 100) con o sin 10 ng/ml de p40 humana (R&D system) o p40N303Q-hFc-5 en medio

RPMI1640 (Cambrex, Charles City) suplementado con FBS al 10%, y antibióticos. Después del día 6, se midieron las células positivas para CD4 e IL-17 mediante el análisis FACS. Tal como se muestra en la Fig. 7(c), p40N303Q-hFc-5 mostró un efecto supresor más fuerte sobre la generación de células CD4⁺/IL-17⁺ que la proteína p40, indicando la función inhibidora de p40N303Q-hFc-5 sobre la polarización de Th17.

5

[0141] Para investigar la bioactividad *in vitro* de la proteína TNFR-hFc, se cultivaron células L929 de murino en medio RPMI1640 (Cambrex, Charles City) suplementado con FBS al 10% y antibióticos. Se configuró el ensayo de inhibición citopática sembrando 3×10^4 células en los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillo (Corning, Países Bajos), a continuación se trataron con 1 ng/ml de TNF- α . Las muestras con las diluciones en serie (que variaban desde 15,6 a 1.000 ng/ml en 2 veces) de TNFR-hFc-5 y Enbrel® (etanercept, Amgen) se añadieron a estos pocillos y se incubaron las placas a 37° C durante 48 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. Tras la incubación, se llevó a cabo el ensayo MTT utilizando un kit de ensayo colorimétrico de crecimiento celular (Sigma-Aldrich, Corea), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tal como se ilustra en la Fig. 7(d), TNFR-hFc-5 mostró una bioactividad *in vitro* ligeramente mayor que Enbrel®.

15

[0142] Para investigar las bioactividades *in vitro* de las proteínas thFc-I-AL(0)-IFN-beta y thFc-1-AL(3)-IFN-beta, se cultivaron células WISH (ATCC, CCL-25) en DMEM F12 (Cambrex, Charles City) suplementado con FBS al 10% y antibióticos. Se configuró el ensayo de inhibición citopática sembrando 3×10^4 células en los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos (Corning, Países Bajos), a continuación se trataron con 1.500 UFP/pocillo de VSV (ATCC, VR-158). Las muestras con diluciones en serie de las proteínas (de 40 UI/ml en 2 veces) de IFN-beta recombinante (Norma WHO, NIBSC 00/572), thFc-1-AL(0)-IFN-beta y thFc-1-AL(3)-IFN-beta se añadieron a estos pocillos y se incubaron las placas a 37° C durante 48 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. Tras la incubación, se llevó a cabo el ensayo MTT utilizando un kit de ensayo colorimétrico de crecimiento celular (Sigma-Aldrich, Corea), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tal como se ilustra en la Fig. 7(e), thFc-1-AL(3)-IFN-beta mostró una bioactividad *in vitro* aproximadamente 20 veces mayor que thFc-1-AL(0)-IFN-beta, indicando el importante papel del enlazador de la albúmina en el mantenimiento de la bioactividad del IFN-beta fusionado a Fc.

20

25

[0143] <Ejemplo 7> Vida media *in vivo* de las proteínas fusionadas a hFc purificadas

[0144] Para comparar la vida media de EPO-hFc-1, EPO-hFc-5 y Aranesp, se trataron cinco macacos con estas proteínas en una dosis de 2.400 UI/kg mediante una única inyección subcutánea (SC) o una única inyección intravenosa (IV). Se obtuvieron muestras de sangre de cada mono antes de la inyección y a 1, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 54, 72, 78, 96, 120, 168, 336, 504, y 672 h después de la inyección. Las muestras de sangre se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min hasta coagularse. Después de una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, se obtuvieron sueros de cada muestra y se almacenaron en un congelador. Todas las muestras obtenidas en cada punto se ensayaron para la cuantificación de EPO mediante el kit EPO ELISA (R&D, nº de cat. DEP00). Tal como se muestra en la Fig. 8(a), todos los monos individuales inyectados con EPO-hFc-1 o EPO-hFc-5 mediante las rutas SC o IV mostraron una vida media más larga que los monos individuales inyectados con Aranesp® mediante las rutas SC o IV.

40

[0145] Para investigar la farmacocinética de G-CSF-hFc-1, se administraron 100 µg/kg de LEUCOSTIM® filgrastim, DongA, República de Corea) y G-CSF-hFc-1 mediante las rutas SC o IV a dos ratas Sprague Dawley macho (Charles River Laboratories, Wilmington) por grupo. Se extrajo sangre antes de la inyección y a 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 192 h después de la inyección. Se obtuvieron los sueros por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min tras incubación a temperatura ambiente durante 30 min y se almacenaron en un congelador. Se cuantificaron las muestras con varias veces de dilución tales como 1/2, 1/5, 1/50, 1/250, 1/500 utilizando el kit G-CSF (Biosource, Camarillo, nº KHC2032). Tal como se muestra en la Fig 8(b) G-CSF-hFc-1 inyectada mediante las rutas SC o IV mostró una vida media más larga que LEUCOSTIM® G-CSF-hFc-1 y G-CSF tuvieron 8,76 h y 2,36 h de t_{1/2} *in vivo* tras la administración de SC y 10,42 h y 1,78 h tras la administración IV, respectivamente. Por tanto, G-CSF-hFc-1 y G-CSF mostró un aumento de 3,7 veces tras las inyecciones SC y de 5,9 veces tras la inyección IV, en comparación con LEUCOSTIM®.

50

[0146] Para investigar la farmacocinética de p40N303Q-hFc-5 y Enbrel®, se trataron tres macacos por grupo con una única inyección SC en una dosis de 100 µg/kg. Se obtuvieron las muestras de sangre de cada mono antes de la inyección y a 8, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 336, 504, y 672 h después de la inyección. Se incubaron las muestras de sangre a temperatura ambiente durante 30 min hasta que se coagularon. Después de una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, se obtuvieron sueros de cada muestra y se almacenaron en un congelador. Todas las muestras obtenidas en cada punto se ensayaron para la cuantificación de la p40 humana y TNFR II humano mediante los kits ELISA (R&D system, Minneapolis, nº DY1240 y nº DRT200, respectivamente). Tal como se muestra en la Fig. 8(c),

55

p40N303Q-hFc-5 mostraron una vida media más larga que vida media promedio de Enbrel® de 199 h frente a 127 h), aunque p40N303Q-hFc-5 un valor $C_{\max}$ menor que Enbrel® (promedio de 3 ng/ml frente a 7 ng/ml).

[0147] Para investigar la farmacocinética de TNFR-hFc-5 y Enbrel, se trataron tres ratas Sprague Dawley macho (Charles River Laboratories, Wilmington) por grupo con una inyección SC en una dosis de 500 µg/kg. Se obtuvieron muestras de sangre de cada rata antes de la inyección y a 2, 4, 8, 12, 24, 30, 48, 72 y 120 h después de la inyección. Se incubaron las muestras de sangre a temperatura ambiente durante 30 min hasta que se coagularon. Después de la centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min, se obtuvieron sueros de cada muestra y se almacenaron en un congelador. Se ensayaron todas las muestras obtenidas en cada punto para la cuantificación de TNFR II humano mediante kits ELISA (R&D system, Minneapolis, nº DRT200). Tal como se muestra en la Fig. 8(d), TNFR-hFc-5 mostró un nivel del ABC ligeramente mayor que Enbrel® (promedio de 198,1 frente a 172,9 µg*h/ml), aunque TNFR-hFc-5 mostró una vida media similar a Enbrel® (promedio 28,6 h frente a 29,4 h).

[0148] <Ejemplo 8> Bioactividad *in vivo* de las proteínas fusionadas a hFc purificadas

[0149] Para comparar la bioactividad *in vivo* de EPO-hFc-5 y Aranesp®, se trataron tres macacos por grupo con una inyección SC o una única inyección IV en una dosis de 2.400 UI/kg. Se obtuvieron muestras de sangre de cada mono antes de la inyección y a 1, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 54, 72, 78, 96, 120, 168, 336, 504, y 672 h después de la inyección. Se midió el número de las diversas células de la sangre, incluyendo los reticulocitos para evaluar la bioactividad *in vivo* de EPO-hFc-5 y Aranesp®. Tal como se muestra en la Fig 9(a), EPO-hFc-5 mostró una potencia *in vitro* ligeramente mayor que Aranesp® en las rutas SC e IV en términos de aumento de los reticulocitos en monos.

[0150] Para investigar la bioactividad *in vivo* de G-CSF-hFc-1, se administraron LEUCOSTIM®filgrastim, (DongA, República de Corea) como control y G-CSF-hFc-1 en una dosis de 100 µg/kg mediante las rutas SC o IV a dos ratas Sprague Dawley macho (Charles River Laboratories, Wilmington) por grupo. Se obtuvo sangre utilizando un tubo de EDTA antes de la inyección y a 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 192 h después de la inyección. Se trató cada muestra de sangre con tampón de lisis RBC (BD Bioscience, Corea) durante 4 minutos y se llevó a cabo un recuento de los leucocitos totales (glóbulos blancos de la sangre) diluidos en tampón FACS por triplicado utilizando un hematocitómetro. Se midió el número de granulocitos FACSCalibur mediante la determinación del tamaño celular por FSC (dispersión hacia delante) y de los gránulos mediante SSC (dispersión lateral). Tal como se ilustra en la Fig. 9(b), LEUCOSTIM® tratado mediante las rutas SC e IV indujo el número máximo de leucocitos y granulocitos a las 24 horas de la inyección, mientras que G-CFS-hFc-1 indujo el número máximo de leucocitos y granulocitos a las 72 horas de la inyección SC y a las 48 horas de la inyección IV. Desde las 24 h a las 120 h después de la inyección, G-CSF-hFc-1 tuvo una bioactividad *in vivo* más sostenida, en comparación con LEUCOSTIM®.

Aplicabilidad industrial

[0151] Se dan a conocer proteínas de fusión que comprenden una molécula biológicamente activa y un dominio Fc de la inmunoglobulina (Ig) que están unidos a la molécula biológicamente activa. El dominio Fc es un dominio Fc humano híbrido de (i) IgG1, IgG2 o IgG4 o (ii) IgG4 e IgD. El Fc híbrido es útil como un vehículo de moléculas biológicamente activas.

<110> Genexine Co., Ltd.
POSTECH Academy-Industry Foundation

<120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE INMUNOGLOBULINA

<150> US60/940,753

<151> 30-05-2007

<160> 32

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 720

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento 1 de Fc híbrido (hFc-1)

<400> 1

5

```

agcaacacca aggtggacaa gagagtggaa cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc      60
cctccctgcc ccgccccctcc cgtggccggc cccagcgtgt tcctgtttcc tcccaagccc      120
aaggataccc tgatgatctc cagaacccct gaggtgacct gcgtggtcgt ggatgtgagc      180
caggaagatc ccgaagtgca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaagt gcacaacgcc      240
aagaccaagc ccagagaaga gcagttcaac tccacctaca gagtggtgag cgtgctgacc      300
gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaagggtgtc caacaaaggc      360
ctgcccagct ccatcgagaa gaccatcagc aaagccaaag gccagcccag agaaccccag      420
gtgtacaccc tgctcccag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc      480
ctggtgaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa cggccagccc      540
gagaacaatt acaagacaac ccctcccgtg ctggatagcg atggcagctt ctttctgtac      600
agcagactga ccgtggacaa gagcagatgg caggaaggca acgtgttcag ctgcagcgtg      660
atgcacgaag ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag      720

```

<210> 2

<211> 660

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento 2 de Fc híbrido (hFC-2)

15

<400> 2

acccccgagt gccccagcca caccagccc ctgggcgtgt tcctgttccc cccaagccc	60
aaggacaccc tgatgatcag ccgcaccccc gaggtgacct gcgtggtcgt ggatgtgagc	120
caggaagatc ccgaagtgca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaagt gcacaacgcc	180
aagaccaagc ccagagaaga gcagttcaac tccacctaca gagtggtagag cgtgctgacc	240
gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaagggtgc caacaaaggc	300
ctgcccagct ccatcgagaa gaccatcagc aaagccaaag gccagcccag agaaccacag	360
gtgtacaccc tgcttcccag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc	420
ctggtgaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa cggccagccc	480
gagaacaatt acaagacaac ccctcccgtg ctggatagcg atggcagctt ctttctgtac	540
agcagactga ccgtggacaa gagcagatgg caggaaggca acgtgttcag ctgcagcgtg	600
atgcacgaag ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag	660

<210> 3

<211> 675

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento 3 de Fc híbrido (hFC-3)

10

<400> 3

gagcgcgaga ccaagacccc cgagtgcgcc agccacaccc agcccctggg cgtgttcctg	60
ttccccccca agcccaagga caccctgatg atcagccgca cccccgaggt gacctgcgtg	120
gtcgtggatg tgagccagga agatcccgaa gtgcagttca actggtacgt ggatggcgtg	180
gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga gaagagcagt tcaactccac ctacagagtg	240
gtgagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag	300
gtgtccaaca aaggcctgcc cagctccatc gagaagacca tcagcaaagc caaaggccag	360
cccagagaac cccaggtgta caccctgcct cccagccagg aagagatgac caagaaccag	420
gtgtccctga cctgcctggt gaaaggcttc taccgccagc acatcgccgt ggagtgggaa	480
agcaacggcc agcccgagaa caattacaag acaaccctc ccgtgctgga tagcgatggc	540
agcttctttc tgtacagcag actgaccgtg gacaagagca gatggcagga aggcaacgtg	600
ttcagctgca gcgtgatgca cgaagccctg cacaaccact acaccagaa gagcctgtcc	660
ctgagcctgg gcaag	675

<210> 4

<211> 705

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento 4 de Fc híbrido (hFC-4)

10

<400> 4

aagaaggaga aggagaagga ggagcaggag gagcgcgaga ccaagacccc cgagtgcccc	60
agccacacccc agccctggg cgtgttcctg ttccccccca agccaagga caccctgatg	120
atcagccgca ccccgaggt gacctgcgtg gtcgtggatg tgagccagga agatcccgaa	180
gtgcagttca actggtacgt ggatggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga	240
gaagagcagt tcaactccac ctacagagtg gtgagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac	300
tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag gtgtccaaca aaggcctgcc cagctccatc	360
gagaagacca tcagcaaagc caaaggccag cccagagaaac cccaggtgta caccctgcct	420
cccagccagg aagagatgac caagaaccag gtgtccctga cctgcctggg gaaaggcttc	480
taccccgagc acatcgccgt ggagtgggaa agcaacggcc agcccgagaa caattacaag	540
acaaccctc ccgtgctgga tagcgatggc agcttctttc tgtacagcag actgaccgtg	600
gacaagagca gatggcagga aggcaacgtg ttcagctgca gcgtgatgca cgaagccctg	660
cacaaccact acaccagaa gagcctgtcc ctgagcctgg gcaag	705

<210> 5

<211> 735

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento 5 de Fc híbrido (hFC-5)

10

<400> 5

cgcaacaccg gccgcggcgg cgaggagaag aagaaggaga aggagaagga ggagcaggag	60
gagcgcgaga ccaagacccc cgagtgcgcc agccacaccc agcccctggg cgtgttctg	120
ttcccccca agcccaagga caccctgatg atcagccgca ccccagaggt gacctgcgtg	180
gtcgtggatg tgagccagga agatcccgaa gtgcagttca actggtacgt ggatggcgtg	240
gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga gaagagcagt tcaactccac ctacagagtg	300
gtgagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag	360
gtgtccaaca aaggcctgcc cagctccatc gagaagacca tcagcaaagc caaaggccag	420
cccagagAAC cccaggtgta caccctgcct cccagccagg aagagatgac caagaaccag	480
gtgtccctga cctgcctggt gaaaggcttc tccccagcg acatcgccgt ggagtgggaa	540
agcaacggcc agcccagaa caattacaag acaacccctc ccgtgctgga tagcgatggc	600
agcttctttc tgtacagcag actgaccgtg gacaagagca gatggcagga aggcaacgtg	660
ttcagctgca gcgtgatgca cgaagccctg cacaaccact acaccagaa gagcctgtcc	720
ctgagcctgg gcaag	735

<210> 6

<211> 864

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento 6 de Fc híbrido (hFc-6)

10

<400> 6

gctagcaaga gcaagaagga gatcttccgc tggcccgaga gcccgaaggc ccaggccagc	60
agcgtgccca ccgcccagcc ccaggccgag ggcagcctgg ccaaggccac caccgcccc	120
gccaccaccc gcaacaccgg ccgcggcggc gaggagaaga agaaggagaa ggagaaggag	180
gagcaggagg agcgcgagac caagaccccc gagtgccca gccacacca gccctgggc	240
gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagccgcac ccccgaggtg	300
acctgcgtgg tcgtggatgt gagccaggaa gatccogaag tgcagttcaa ctggtacgtg	360
gatggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aagagcagtt caactccacc	420
tacagagtgg tgagcgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	480
aagtgcaagg tgtccaacaa aggcctgccc agtccatcg agaagaccat cagcaaagcc	540
aaaggccagc ccagagaacc ccagggtgtac accctgcctc ccagccagga agagatgacc	600
aagaaccagg tgtccctgac ctgcctggtg aaaggettct accccagcga catcgccgtg	660
gagtgggaaa gcaacggcca gcccgagaac aattacaaga caaccctcc cgtgctggat	720
agcgatggca gcttctttct gtacagcaga ctgaccgtgg acaagagcag atggcaggaa	780
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaagccctgc acaaccacta caccagaag	840
agcctgtccc tgagcctggg caag	864

<210> 7

<211> 579

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> gen de EPO humana sintetizado de acuerdo con la optimización por codón

10

<400> 7

atgggcgtgc acgagtgcc cgccctggctg tggctgctgc tgagcctgct gagcctgccc	60
--	-----------

```

ctgggcctgc ccgtgctggg cgcgcgcgcgc cgctgatct ggcacagccg cgtgctggag      120
cgctacctgc tggaggccaa ggaggccgag aacatcacca ccggctgcgc cgagcactgc      180
agcctgaacg agaacatcac cgtgcccgcac accaaggtga acttctacgc ctggaagcgc      240
atggaggtgg gccagcaggc cgtggaggtg tggcagggcc tggccctgct gagcgaggcc      300
gtgctgcgcg gccaggccct gctggtgaac agcagccagc cctgggagcc cctgcagctg      360
cacgtggaca aggcctgag cggcctgcgc agcctgacca ccctgctgcg cgcctgggc      420
gccagaagg aggcctcag ccccccgac gccgccagcg ccgccccct gcgcaccatc      480
accgccgaca ccttccgcaa gctgttccgc gtgtacagca acttcctgcg cggcaagctg      540
aagctgtaca ccggcgaggc ctgccgcacc ggcgaccgc      579

```

<210> 8

<211> 612

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> gen de G-CSF humano sintetizado de acuerdo con la optimización por codón

10

<400> 8

```

atggccggcc ccgccacca gagcccatg aagctgatgg ccctgcagct gctgctgtgg      60
cacagcgccc tgtggaccgt gcaggaggcc acccccctgg gcccgcagc cagcctgccc      120
cagagcttcc tgetgaagtg cctggagcag gtgcgcaaga tccagggcga cggcgccgcc      180
ctgcaggaga agctgtgcgc cacctacaag ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctg      240
ggccacagcc tgggcatccc ctgggccccc ctgagcagct gcccagcca ggccctgcag      300
ctggccgggt gcctgagcca gctgcacagc ggccgtgtcc tgtaccaggg cctgctgcag      360
gccctggagg gcatcagccc cgagctgggc cccaccctgg acaccctgca gctggacgtg      420
gccgacttcg ccaccacat ctggcagcag atggaggagc tgggcatggc ccccgccctg      480
cagccacccc agggcgccat gccgccttc gccagcgctc tccagcgccg cgcggggcgc      540
gtgctggtgg ccagccacct gcagagcttc ctggaggtga gctaccgct gctgcgccac      600
ctggcccagc cc      612

```

15 <210> 9

<211> 984

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> gen p40 humano sintetizado de acuerdo con la optimización por codón

<400> 9

atgtgccacc agcagctggt gatcagctgg ttcagcctgg tgttcctggc cagccccctg	60
gtggccatct gggagctgaa gaaggacgtg tacgtggtgg agctggactg gtaccccgac	120
gcccccggcg agatggtggt gctgacctgc gacacccccg aggaggacgg catcacctgg	180
accctggacc agagcagcga ggtgctgggc agcggcaaga ccctgaccat ccagggtgaag	240
gagttcggcg acgcccggca gtacacctgc cacaagggcg gcgagggtgct gagccacagc	300
ctgctgctgc tgcacaagaa ggaggacggc atctggagca ccgacatcct gaaggaccag	360
aaggagccca agaacaagac cttcctgcgc tgcgaggcca agaactacag cggccgcttc	420
acctgctggt ggctgaccac catcagcacc gacctgacct tcagcgtgaa gagcagccgc	480
ggcagcagcg acccccaggg cgtgacctgc ggcgcccga ccctgagcgc cgagcgcgtg	540
cgcggcgaca acaaggagta cgagtacagc gtggagtgcc aggaggacag cgcctgcccc	600
gccgccgagg agagcctgcc catcgagggtg atggtggacg ccgtgcacaa gctgaagtac	660
gagaactaca ccagcagctt cttcatccgc gacatcatca agccccgacc ccccaagaac	720
ctgcagctga agccccctgaa gaacagccgc cagggtggagg tgagctggga gtaccccgac	780
acctggagca cccccacag ctacttcagc ctgaccttct gcgtgcaggt gcagggcaag	840
agcaagcgcg agaagaagga ccgcgtgttc accgacaaga ccagcgccac cgtgatctgc	900
cgcaagcagg ccagcatcag cgtgcgcgcc caggaccgct actacagcag cagctggagc	960
gagtgggcca gcgtgccctg cagc	984

5

<210> 10

<211> 5698

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pAD11

15 <400> 10

gacggatcgg gactagagca ttggggggggg ggacagctca gggctgcgat ttcgcgccaa	60
acttgacggc aatcctagcg tgaaggctgg taggatttta tccccgctgc catcatgggt	120
cgaccattga actgcatcgt cgccgtgtcc caaaatatgg ggattggcaa gaacggagac	180
ctaccctggc ctccgctcag gaacgagttc aagtacttcc aaagaatgac cacaacctct	240
tcagtgaag gttaaacagaa tctgggtgatt atgggtagga aaacctgggt ctccattcct	300
gagaagaatc gacctttaaa ggacagaatt aatatagttc tcagtagaga actcaaagaa	360
ccaccacgag gagctcattt tcttgccaaa agtttggatg atgccttaag acttattgaa	420
caaccggaat tggcaagtaa agtagacatg gtttggatag tcggaggcag ttctgtttac	480

caggaagcca tgaatcaacc aggccacctc agactctttg tgacaaggat catgcaggaa	540
tttgaaagtg acacgttttt cccagaaatt gatttgggga aatataaact tctcccagaa	600
taccagggcg tcctctctga ggtccaggag gaaaaaggca tcaagtataa gtttgaagtc	660
tacgagaaga aagactaaca ggaagatgct ttcaagttct ctgctccct cctaaagcta	720
tgcattttta taagaccatg ggacttttgc tggctttaga tctttgtgaa ggaaccttac	780
ttctgtggtg tgacataatt ggacaaacta cctacagaga tttaaagctc taaggtaa	840
ataaaatttt taagtgtata atgtgttaaa ctactgattc taattgtttg tgtattttag	900
attccaacct atggaactga tgaatgggag cagtggtgga atgcctttaa tgaggaaaac	960
ctgttttgc cagaagaaat gccatctagt gatgatgagg ctactgctga ctctcaacat	1020
tctactcctc caaaaaagaa gagaaaggta gaagaccca aggactttcc ttcagaattg	1080
ctaagtttt tgagtcatgc tgtgtttagt aatagaactc ttgcttgctt tgctatttac	1140
accacaaagg aaaaagctgc actgctatac aagaaaatta tggaaaaata ttctgtaacc	1200
tttataagta ggcataacag ttataatcat aacatactgt tttttcttac tccacacagg	1260
catagagtgt ctgctattaa taactatgct caaaaattgt gtacctttag ctttttaatt	1320
tgtaaagggg ttaataagga atatttgatg tatagtgcct tgactagaga tcataatcag	1380
ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tcccctgaa	1440
cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg tttattgcag cttataatgg	1500
ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc	1560
tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatct cccgatcccc	1620
tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatctgctcc	1680
ctgcttgtgt gttggaggtc gctgagtagt gcgcgagcaa aatttaagct acaacaaggc	1740
aaggcttgac cgacaattgc atgaagaatc tgcttagggg taggcgtttt gcgctgcttc	1800
gcgatgtacg ggccagatat acgcgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat	1860
caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg	1920
taaatggccc gcctggctga ccgcccaacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt	1980
atgttcccat agtaacgccca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac	2040
ggtaaactgc ccacttgga gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg cccctattg	2100
acgtcaatga cggtaaattgg cccgcctggc attatgcccga gtacatgacc ttatgggact	2160
ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggt atgcggtttt	2220
ggcagtacat caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc	2280

ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc	2340
gtaacaactc cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata	2400
taagcagagc tctctggcta actagagaac ccactgctta ctggcttata gaaattaata	2460
cgactcacta tagggagacc caagctggct agcgtgagtt tggggaccct tgattgttct	2520
ttctttttcg ctattgtaaa attcatgtta tatggagggg gcaaagtttt caggggtgtg	2580
tttagaacgg gaagatgtcc cttgtatcac catggaccct catgataatt ttgtttcttt	2640
cactttctac tctgttgaca accattgtct cctcttattt tcttttcatt ttctgtaact	2700
ttttcgtaa actttagctt gcatttgtaa cgaattttta aattcacttt tgtttatttg	2760
tcagattgta agtactttct ctaatcactt ttttttcaag gcaatcaggg tatattatat	2820
tgtacttcag cacagtttta gagaacaatt gttataatta aatgataagg tagaatattt	2880
ctgcatataa attctggctg gcgtggaaat attcttattg gtagaaacaa ctacatcctg	2940
gtcatcatcc tgcctttctc tttatgggta caatgatata cactgtttga gatgaggata	3000
aaatactctg agtccaaacc gggccctct gctaaccatg ttcatgcctt cttctttttc	3060
ctacagctcc tgggcaacgt gctgggtatt gtgctgtctc atcattttgg caaagaattg	3120
taatacgact cactataggg cgaattgaag cttgggtaccg agctcgatc cactagtcca	3180
gtgtgggtga attcaccgcg gccgctctag agggccctat tctatagtgt cacctaaatg	3240
ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc	3300
cctccccctg gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa	3360
atgaggaaat tgcacgcat tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtg	3420
ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gatgcggtg	3480
gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca gctggggctc gagagcttgg cgtaatcatg	3540
gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc	3600
cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc	3660
gttgcgctca ctgccgctt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat	3720
cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttcgctt cctcgctcac	3780
tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggt	3840
aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca	3900
gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggcgc gttgctggcg tttttccata ggctccgcc	3960
ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact	4020
ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacct	4080
gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag	4140

ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcggttcgc tccaagctgg gctgtgtgca	4200
cgaaccccccc gttcagccccg accgctgcgc cttatccggg aactatcgtc ttgagtccaa	4260
cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc	4320
gaggatatgta ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag	4380
aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg	4440
tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg gggttttttg tttgcaagca	4500
gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc	4560
tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag	4620
gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata	4680
tgagtaaact tgggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat	4740
ctgtctattt cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg	4800
ggaggggctta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataaccg cgagaccac gctcaccggc	4860
tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaggggc gagcgagaa gtggtcctgc	4920
aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc	4980
gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc	5040
gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc	5100
ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa	5160
gttgggcgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat	5220
gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcatt tctgagaata	5280
gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca	5340
tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag	5400
gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc	5460
agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc	5520
aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata	5580
ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta	5640
gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtc	5698

<210> 11

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(330)

<223> región constante de la IgG1 humana parcial (Nº de acceso al GenBank CAA75032)

5

<400> 11

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

ES 2 415 604 T3

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> 12

<211> 326

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(326)

<223> región constante de la IgG2 humana (nº de acceso al GenBank CAC20455)

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 327

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(327)

<223> región constante de la IgG4 humana parcial (Nº de acceso al GenBank AAH25985)

<400> 13

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                               325

```

<210> 14

<211> 383

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(383)

<223> región constante de la IgD humana (Nº de acceso al GenBank P01880)

<400> 14

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

Gln Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr
 50 55 60
 Met Thr Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Leu Gln Gln Trp Arg Gln Gly
 65 70 75 80
 Glu Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu
 85 90 95
 Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro
 100 105 110
 Thr Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala
 115 120 125
 Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys
 130 135 140
 Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala
 165 170 175
 Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val
 180 185 190
 Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly
 195 200 205
 Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser
 210 215 220
 Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu
 225 230 235 240
 Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu
 245 250 255
 Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro
 260 265 270
 Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala
 275 280 285
 Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile
 290 295 300
 Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe
 305 310 315 320
 Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala
 325 330 335
 Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr
 340 345 350
 Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala
 355 360 365
 Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His Gly Pro Met

370

375

380

<210> 15

<211> 193

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(193)

<223> precursor de la EPO humana (nº de acceso al GenBank NP_000790)

<400> 15

```

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1           5           10           15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
          20           25           30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
          35           40           45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50           55           60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65           70           75           80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
          85           90           95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
          100          105          110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
          115          120          125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
          130          135          140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
          145          150          155          160

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

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
          180          185          190

Arg

```

15

<210> 16

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

5 <222> (1)..(207)

<223> G-CSF humano (Nº de acceso al GenBank CAA27291)

<400> 16

```

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln
 1           5           10           15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro
 20           25           30

Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu
 35           40           45

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys
 50           55           60

Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
 65           70           75           80

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
 85           90           95

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
100           105           110

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
115           120           125

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
130           135           140

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
145           150           155           160

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
165           170           175

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
180           185           190

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
195           200           205

```

10

<210> 17

<211> 328

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(328)

<223> subunidad p40 de la IL12 (nº de acceso al GenBank AAG32620)

<400> 17

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

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
325

<210> 18

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de hFc-1

10

<400> 18

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

<210> 19

<211> 220

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de hFc-2

10

<400> 19

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

<210> 20

<211> 225

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de hFc-3

10

<400> 20

[illegible]

<210> 21

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> secuencia de aminoácidos de hFc-4

10

<400> 21

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

5 <210> 22
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de hFc-5

<400> 22

```

Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys
 1          5          10          15

Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His
          20          25          30

Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
          35          40          45

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

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 65          70          75          80

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
          85          90          95

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
          100          105          110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
          115          120          125

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
          130          135          140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
          145          150          155          160

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

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
          180          185          190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
          195          200          205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
          210          215          220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
          225          230          235          240

Leu Ser Leu Gly Lys
          245

```

5

<210> 23

<211> 288

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de hFc-6

<400> 23

5

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

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

<210> 24

<211> 377

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(377)

<223> región constante de la IgG3 humana (Nº de acceso al GenBank CAC20456)

<400> 24

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

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

				340					345					350					
	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln			
			355					360					365						
	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
		370					375												

<210> 25

<211> 609

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(609)

<223> albúmina humana (Nº de acceso al GenBank CAA00606)

<400> 25

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

210	215	220
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val 225 230 235 240		
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser 245 250 255		
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly 260 265 270		
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile 275 280 285		
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu 290 295 300		
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp 305 310 315 320		
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser 325 330 335		
Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly 340 345 350		
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val 355 360 365		
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys 370 375 380		
Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu 385 390 395 400		
Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys 405 410 415		
Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu 420 425 430		
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val 435 440 445		
Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His 450 455 460		
Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val 465 470 475 480		
Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg 485 490 495		
Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe 500 505 510		
Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala 515 520 525		
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu 530 535 540		

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu

<210> 26

<211> 762

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento 1 de Fc híbrido 1 (thFc-1)

10

<400> 26

atggatgcca tgctgagagg cctgtgctgc gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg	60
agccccctccg aacccaagag ctgcgacaag acccacacct gccctccctg ccccgcccct	120
cccgtggccg gccccagcgt gttcctgttt cctcccaagc ccaaggatac cctgatgatc	180
tccagaacct ctgaggtgac ctgcgtggtc gtggatgtga gccaggaaga tcccgaagtg	240
cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagaa	300
gagcagttca actccacctc cagagtgggtg agcgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg	360
ctgaacggca aggagtacaa gtgcaagggtg tccaacaaag gcctgcccag ctccatcgag	420
aagaccatca gcaaagccaa aggccagccc agagaacccc aggtgtacac cctgcctccc	480
agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg tccctgacct gcctggtgaa aggcttctac	540
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggaaagc aacggccagc ccgagaacaa ttacaagaca	600
accctcccg tgctggatag cgatggcagc ttctttctgt acagcagact gaccgtggac	660
aagagcagat ggcaggaagg caacgtgttc agctgcagcg tgatgcacga agccctgcac	720
aaccactaca ccagaagag cctgtccctg agcctgggat cc	762

15 <210> 27

<211> 759

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> fragmento 2 de Fc híbrido (thFc-2)

<400> 27

atggatgcca tgctgagagg cctgtgctgc gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg	60
agcccctcca aggaggagca ggaggagcgc gagaccaaga ccccgagtg cccagccac	120
accagcccc tgggcgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct gatgatcagc	180
cgcacccccg aggtgacctg cgtggtcgtg gatgtgagcc aggaagatcc cgaagtgcag	240
ttcaactggt acgtggatgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaagag	300
cagttcaact ccacctacag agtggtgagc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg	360
aacggcaagg agtacaagtg caaggtgtcc aacaaaggcc tgcccagctc catcgagaag	420
accatcagca aagccaaagg ccagcccaga gaaccccagg tgtacacct gcctcccagc	480
caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgcc tggtgaaagg cttctacccc	540
agcgacatcg ccgtggagtg ggaaagcaac ggccagcccg agaacaatta caagacaacc	600
cctcccgtgc tggatagcga tggcagcttc tttctgtaca gcagactgac cgtggacaag	660
agcagatggc aggaaggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaagc cctgcacaac	720
cactacaccc agaagagcct gtccctgagc ctgggcaag	759

5

<210> 28

<211> 254

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de thFc-1

15 <400> 28

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

5 <210> 29
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> secuencia de aminoácidos de thFc-2

<400> 29

```

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1          5          10          15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr
 20          25          30

Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu
 35          40          45

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 65          70          75          80

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

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

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
130          135          140

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
145          150          155          160

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
165          170          175

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
195          200          205

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
210          215          220

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
225          230          235          240

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
245          250

```

<210> 30

10 <211> 771

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> gen del receptor 2 del TNF soluble humano sintetizado de acuerdo con la optimización por codón

<400> 30

atggctcccg tggccgtgtg ggccgctctg gccgtgggcc tggagctgtg ggccgctgcc	60
cacgccttgc ctgccaggt ggcctttaca ccctatgtct ccgagcccg cagcacctgc	120
agactgagag agtactacga ccagacagcc cagatgtgtt gcagcaagt cagccccggc	180
cagcacgcca aggtgttctg caccaagacc agcgacaccg tgtgtgacag ctgcgaggac	240
agcacctaca ccagctgtg gaactgggtg cccgagtgcc tgagctgtgg cagcagatgc	300
agctccgacc aggtggagac ccaggcctgc accagagagc agaatagaat ctgcacctgc	360
agacctggct ggtactgtgc cctgagcaag caggagggtc gcagactgtg tgcccctctg	420
agaaagtgca gacctggctt tggcgtggcc agacccggca ccgagaccag cgacgtggtg	480
tgcaaaccct gtgcccctgg caccttcagc aacaccacat ccagcaccga catctgcaga	540
ccccaccaga tctgcaacgt ggtggccatt cccggcaatg ccagcatgga tgccgtgtgc	600
accagcacca gccccaccag aagcatggcc cctggcgccg tgcacctgcc ccagcccggtg	660
agcaccagaa gccagcacac ccagcccaca cccgagccca gcacagcccc tagcaccagc	720
ttcctgctgc ccatgggccc cagccctcct gccgagggca gcacaggcga t	771

10

<210> 31
<211> 257
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> receptor 2 del TNF soluble humano codificado por el gen sintetizado de acuerdo con la optimización por codón

20 <400> 31

```

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1          5          10          15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
          20          25          30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
          35          40          45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50          55          60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65          70          75          80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
          85          90          95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
          100          105          110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
          115          120          125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
          130          135          140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
          145          150          155          160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
          165          170          175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
          180          185          190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
          195          200          205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
          210          215          220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
          225          230          235          240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
          245          250          255

```

Asp

<210> 32
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> enlazador de Gly-Ser

5 <400> 32

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido representado por la siguiente fórmula

5
$$N'-(Z1)_p-Y-Z2-Z3-Z4-C'$$

en la que:

N' es el extremo N y C' es el extremo C del polipéptido.

10

Z1 es una secuencia de aminoácidos que consta de 5 a 9 restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de los restos de aminoácidos en las posiciones 90 a 98 de la SEQ ID NO: 14;

15 Y es una secuencia de aminoácidos que consta de 5 o más restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de los restos de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14;

Z2 es una secuencia de aminoácidos que consta de los restos de aminoácidos en las posiciones 163 a 170 de la SEQ ID NO: 14;

20 Z3 es una secuencia de aminoácidos que consta de los restos de aminoácidos en las posiciones 121 a 220 de la SEQ ID NO: 13;

Z4 es una secuencia de aminoácidos que consta de los restos de aminoácidos en las posiciones 221 a 327 de la SEQ ID NO: 13; y

25

p es un número entero de 0 o 1.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que p es 0.

30 3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 28 o 29.

4. Un polipéptido quimérico que es una fusión que comprende un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un polipéptido, proteína o péptido fusionado en el extremo N o el extremo C del polipéptido.

35

5. El polipéptido quimérico de la reivindicación 4, en el que la fusión del polipéptido, proteína o péptido tiene una vida media en circulación aumentada en comparación con la vida media en circulación de la forma natural.

6. El polipéptido quimérico de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el polipéptido, proteína o péptido es una hormona, citocina, factor de crecimiento, molécula coestimuladora, receptor de hormona, receptor de citocina, receptor de factor de crecimiento, o péptido corto.

7. El polipéptido quimérico de una cualquiera de la reivindicación 4 a 6, en el que el polipéptido, proteína o péptido es EPO, G-CSF, GM-CSF, insulina, hormona del crecimiento humano, GLP-1, p40, receptor de TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, proteína 1 morfogenética ósea, betacelulina, interferón alfa, IL-10, FSH, Factor VII, CTLA4, IFN-beta, PD-1, IL-10R, CXCL-11, receptor de TGF-beta, TGF-beta, IL-17, IL-17R, BTC, OPG o RANK, o una de sus variantes.

8. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el polipéptido, proteína o péptido es una variante de p40 que contiene la sustitución Asn303Gln.

50

9. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que el polipéptido, proteína o péptido es una proteína secretada, una forma madura de una proteína secretada, o una región Fab de un anticuerpo.

55

10. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el polipéptido, proteína o péptido se acoplan entre sí mediante un enlazador.

11. El polipéptido quimérico de la reivindicación 10, en el que el enlazador es un enlazador de albúmina o

un enlazador sintético.

12. El polipéptido quimérico de la reivindicación 11, en el que:

5 (a) dicho enlazador de albúmina comprende las secuencias 321 a 323, 318 a 325, 316 a 328, 313 a 330, 311 a 333, o 306 a 338 de la SEQ ID NO: 25; o

(b) dicho enlazador sintético es un péptido de 10 a 20 restos de aminoácidos, en el que el péptido está compuesto por restos de Gly y Ser.

10

13. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

14. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación

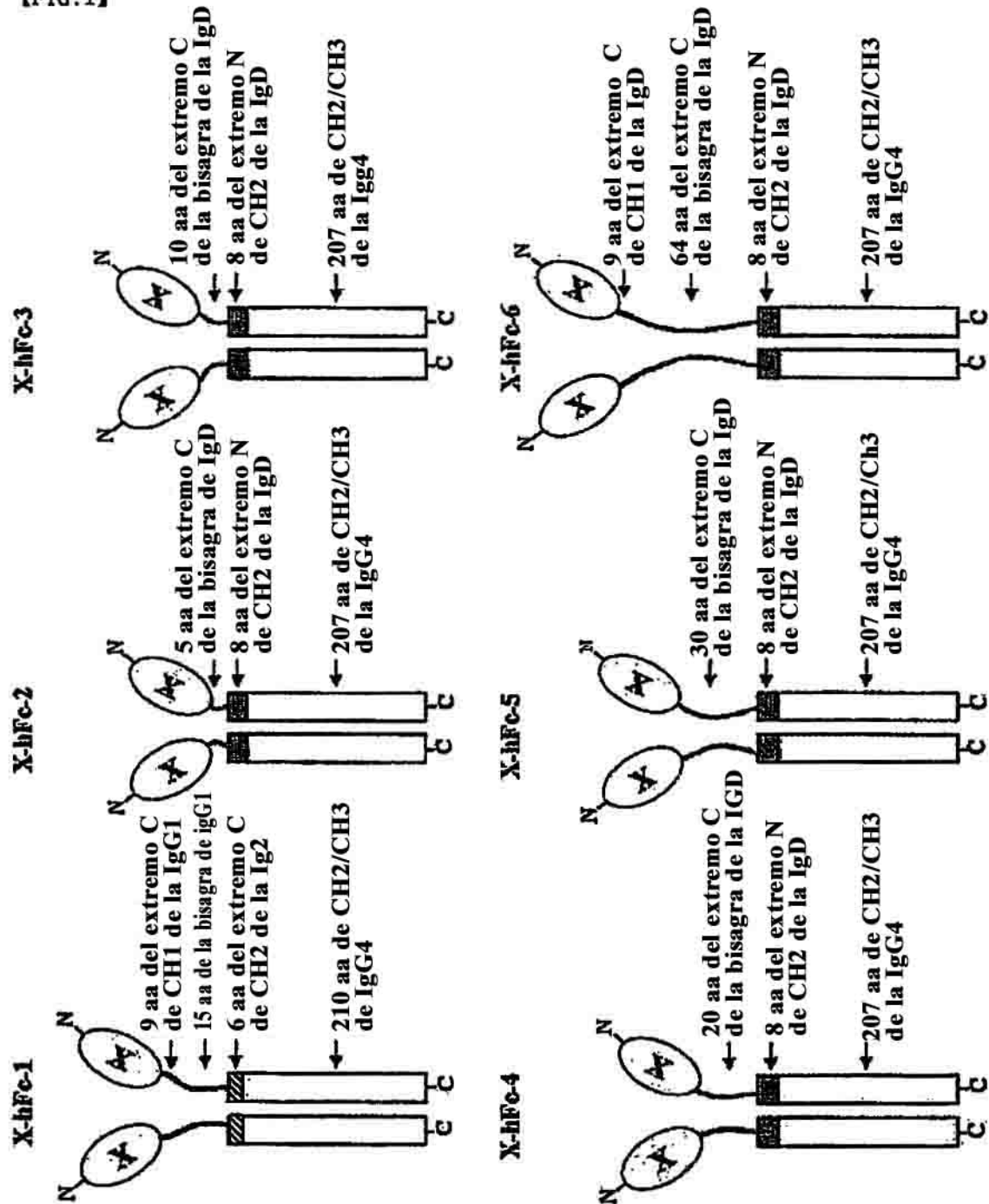
15 13.

15. Un procedimiento para producir el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el procedimiento comprende las etapas de. (i) introducir una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13 en una célula hospedadora de mamífero, (ii) hacer crecer la célula en condiciones en las que se pueda expresar el polipéptido en su medio de crecimiento, y (iii) cosechar el polipéptido expresado.

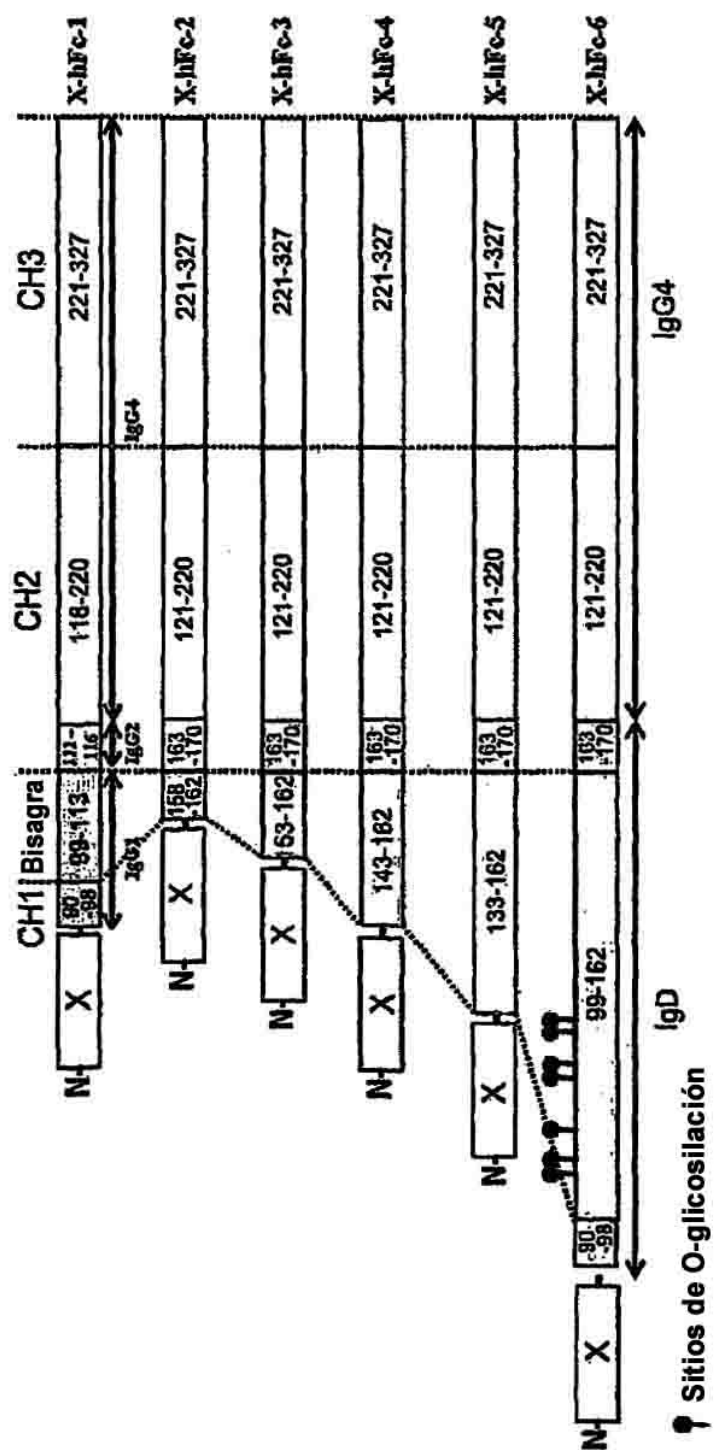
20

16. Un polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 para uso en un procedimiento de tratamiento médico.

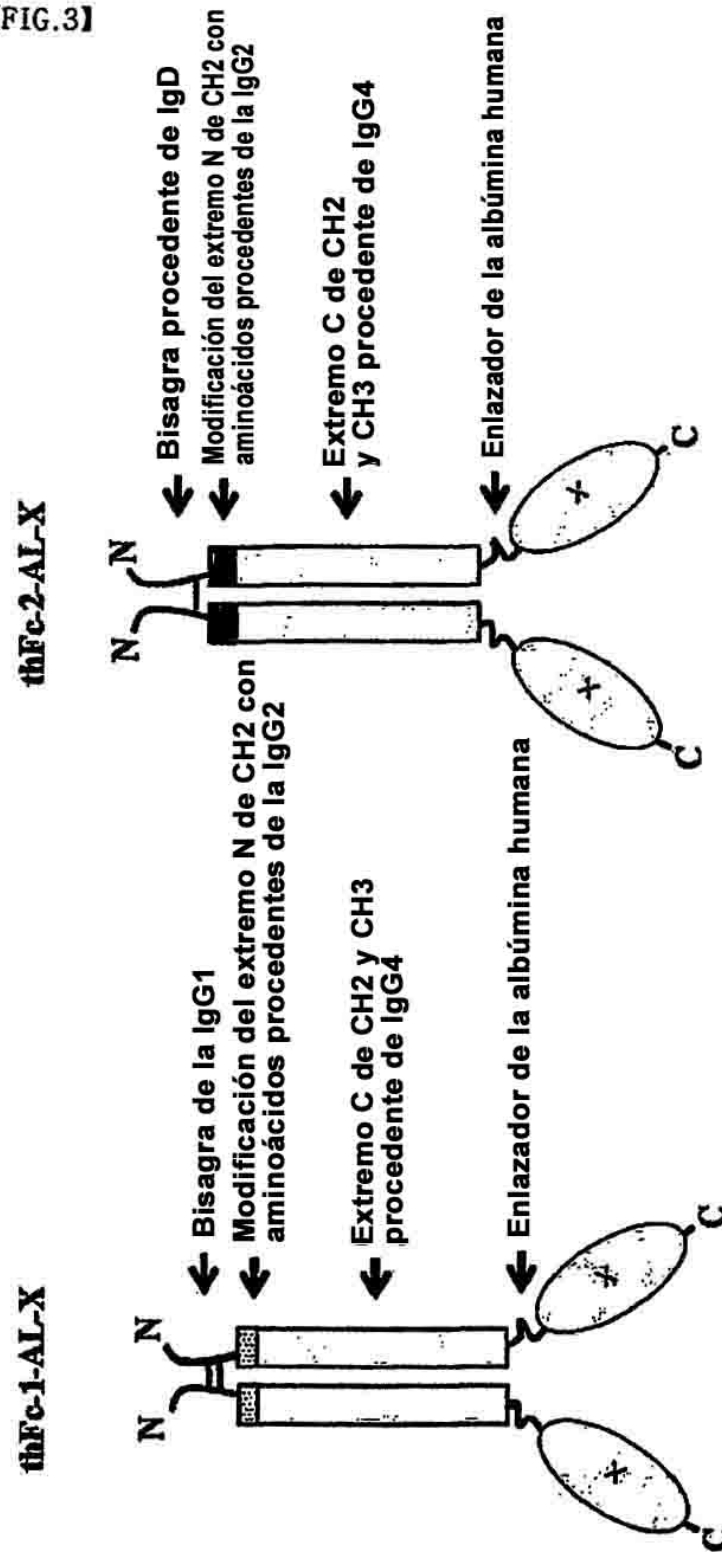
[FIG. 1]



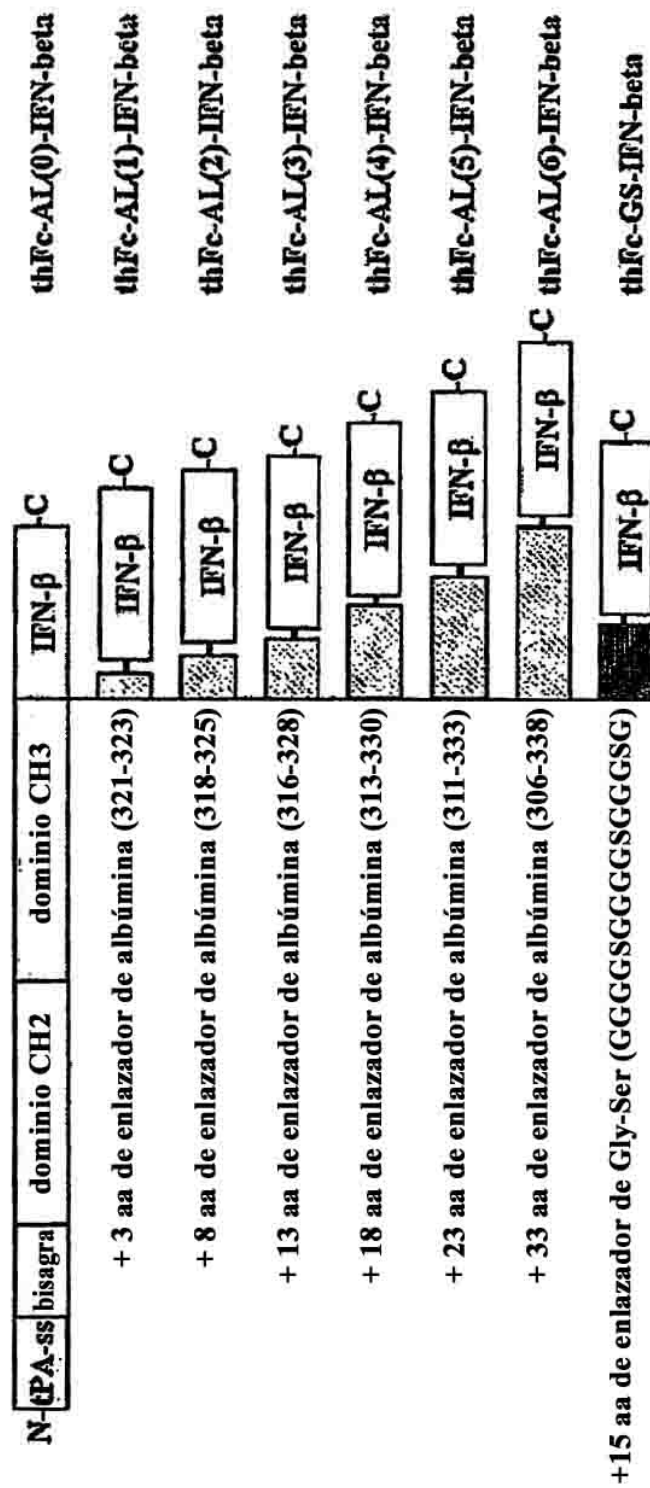
【FIG.2】



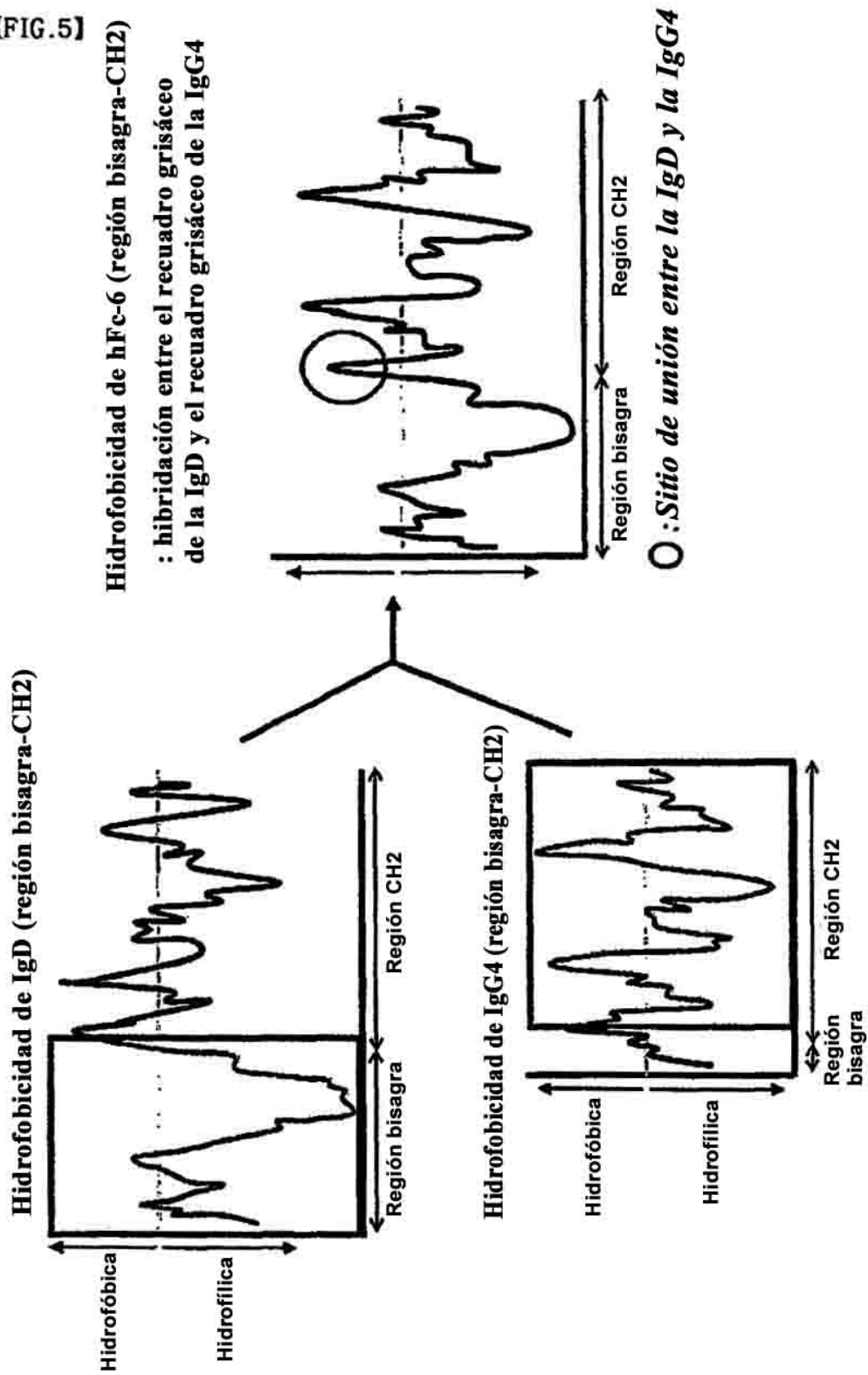
[FIG.3]



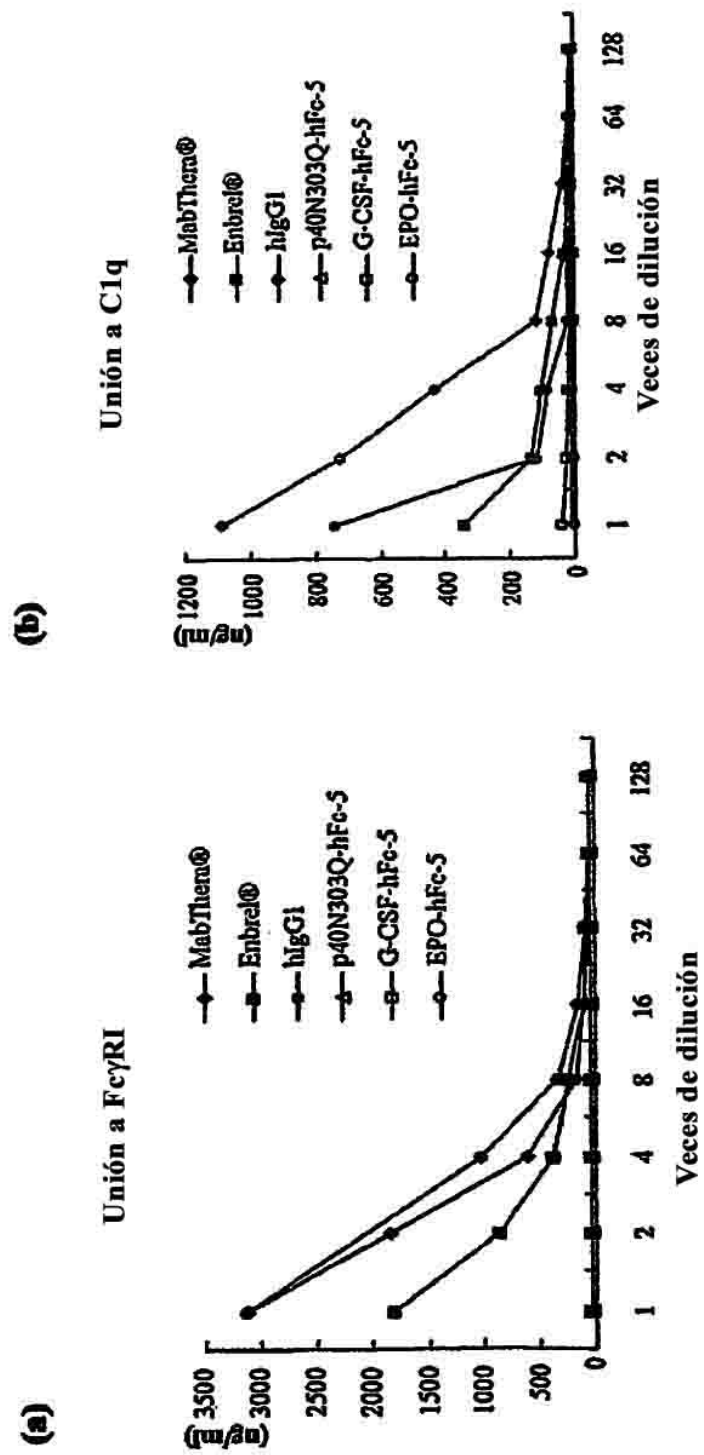
【FIG. 4】



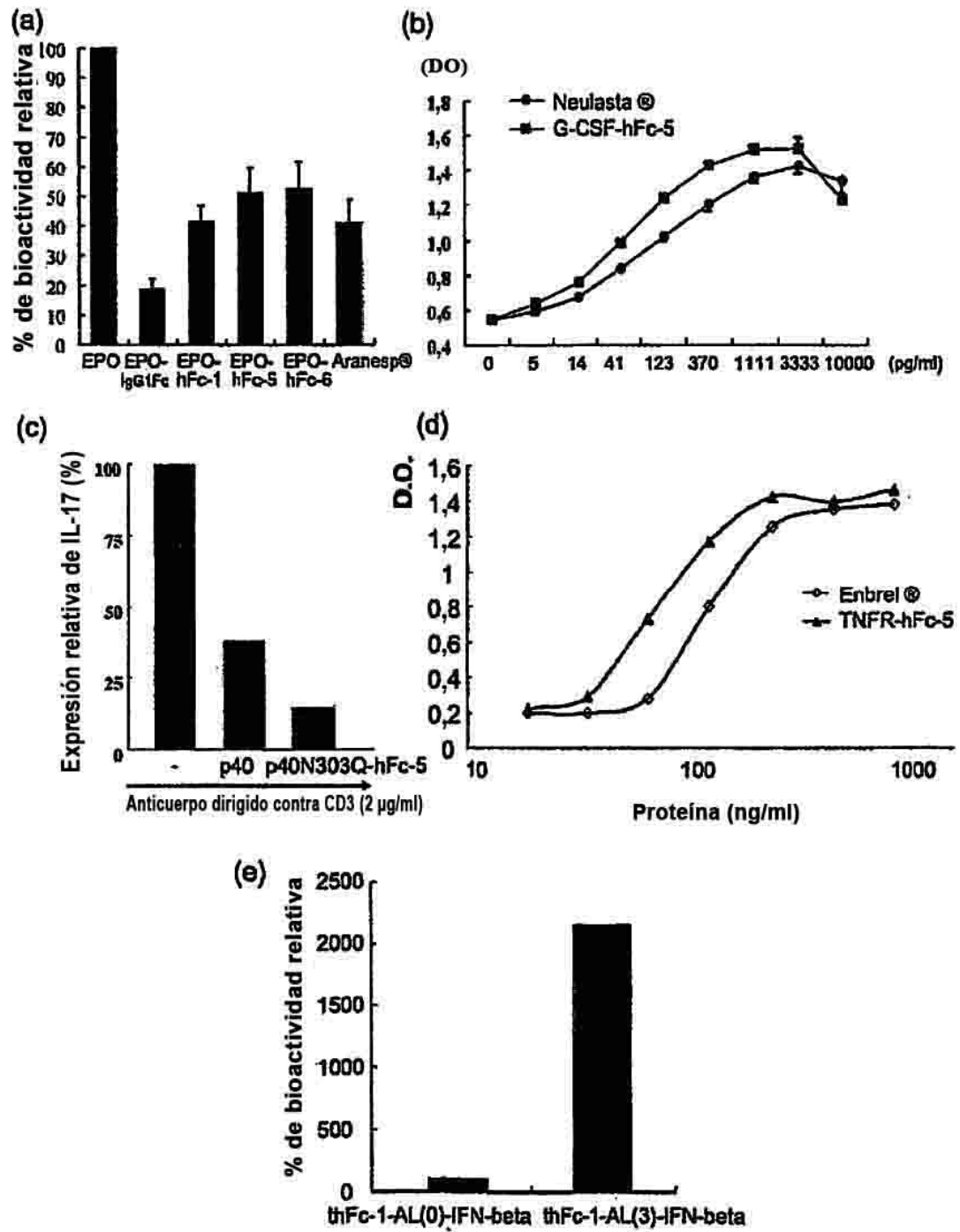
[FIG. 5]



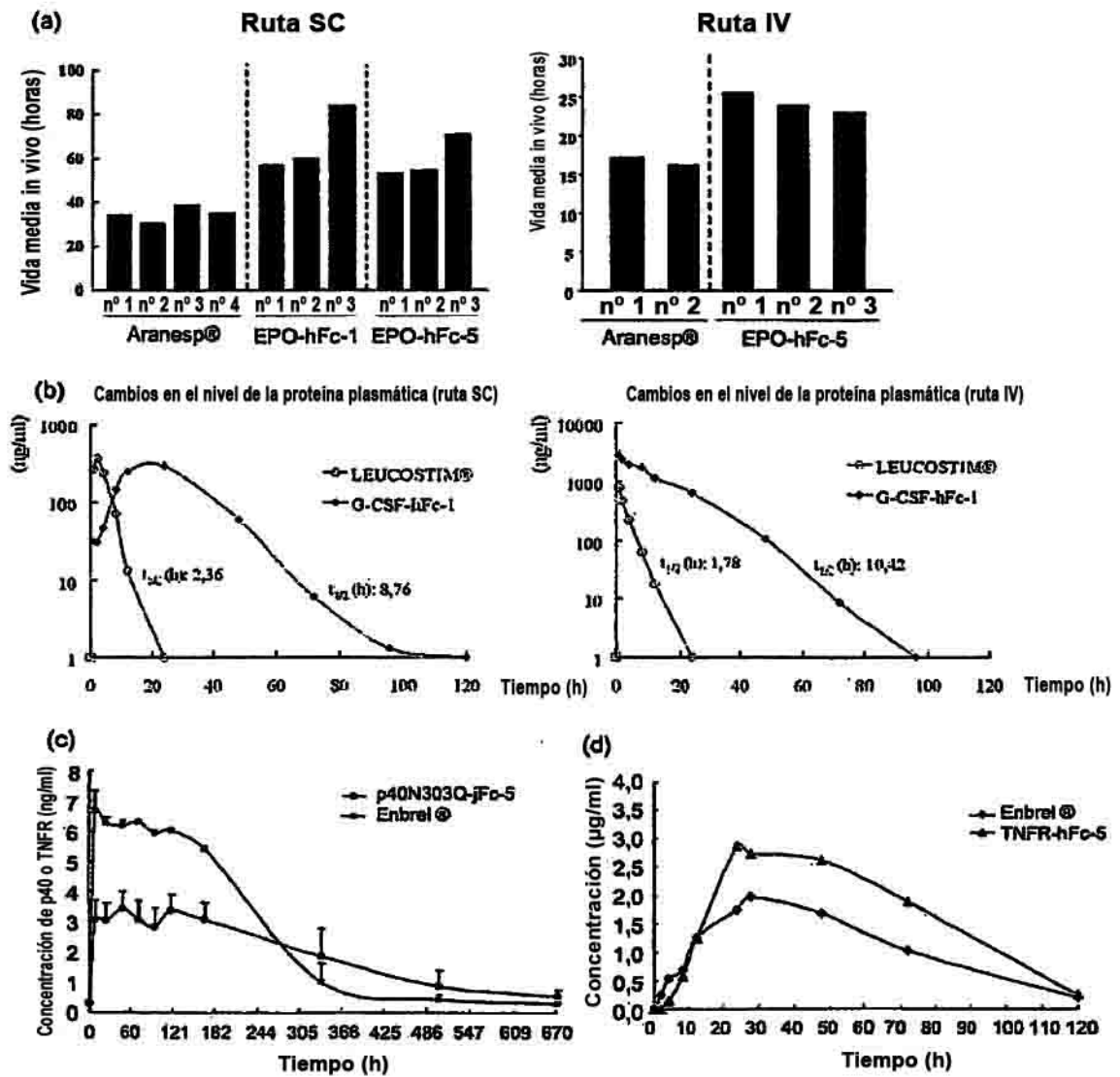
【FIG.6】



【FIG. 7】



【FIG.8】



【FIG. 9】

