

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 894**

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2005 E 05744914 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1765872**

54 Título: **Inmunoglobulina glicosilada e inmunoadesina que la comprende**

30 Prioridad:

**31.05.2004 KR 2004038833**

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

**12.11.2013**

73 Titular/es:

**MEDEXGEN INC. (100.0%)  
2nd Floor, Medical Bldg 1 Hanyang Univ, College  
of Medicine 17 Haengdan-dong, Seongdon-gu  
Seoul 133-791, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YONG-HOON;  
YI, KI-WAN;  
CHO, HOON-SIK;  
PARK, HONG-GYU y  
KIM, KWANG-SEONG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 428 894 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

Inmunoglobulina glicosilada e inmunoadhesina que la comprende

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una inmunoglobulina glicosilada y a una inmunoadhesina que la comprende. Más particularmente, la presente invención se refiere a una inmunoglobulina o a un fragmento de la misma que está adicionalmente glicosilado por modificación de un residuo aminoácido específico, y a una proteína de fusión glicosilada formada como resultado del enlace de la inmunoglobulina glicosilada o un fragmento de la misma con al menos una proteína biológicamente activa o una porción de la misma.

Técnica de antecedentes

15 Las inmunoadhesinas (o proteínas de fusión de inmunoglobulina) son moléculas similares a anticuerpos que resultan de la fusión de un fragmento (p. ej. porción Fc) de una inmunoglobulina y una región de unión al ligando de un receptor o una molécula adhesiva. Las inmunoadhesinas típicas conocidas en la técnica tienen la estructura de un anticuerpo en el que la región variable que participa en el reconocimiento del antígeno, está reemplazada por una región de unión al ligando de un receptor, al tiempo que conserva la porción Fc. Durante mucho tiempo, un gran número de patentes ha descrito proteínas de fusión en las que una región específica de una proteína fisiológicamente activa está enlazada a un anticuerpo (patentes de EE.UU. N°s 5.521.288, 5.844.095, 6.046.310, 6.090.914, 6.100.383 y 6.225.448).

La inmunoadhesina tiene las siguientes ventajas frente a una molécula que no contiene una inmunoglobulina:

- 25 1) la proteína de fusión tiene una avidéz total incrementada por un ligando, ya que tiene bivalencia en una forma dímera;
- 2) la proteína de fusión está presente en una forma no destruida en el suero durante un período de tiempo más largo en virtud de una estabilidad molecular incrementada;
- 3) células efectoras son activadas por la porción Fc (fragmento cristalizante) de la cadena pesada de inmunoglobulina; y
- 30 4) la proteína de fusión es aislada y purificada por un método conveniente, por ejemplo utilizando proteína A.

Por ejemplo, en el caso del factor de necrosis tumoral (al que se alude aquí en lo que sigue simplemente como "TNF") en calidad de una citoquina, para suprimir respuestas de inflamación dependientes de TNF, se puede utilizar un receptor del factor de necrosis tumoral (al que se alude aquí en lo que sigue simplemente como "TNFR") según se describe en las publicaciones PCT N°s WO 92/16221 y WO 95/34326, o se puede utilizar una proteína de fusión de TNFR-inmunoglobulina (Ig) según se describe en la patente de EE.UU. N° 5.447.851 y en la publicación PCT N° WO 94/06476. De acuerdo con numerosos informes, proteínas de fusión de TNFR-Ig tienen una afinidad mucho mayor al TNF que la forma monómera nativa o una forma no fusionada a Ig de TNFR (Lesslauer W. et al. Eur. J. Immunol., 1991, vol. 21, pág. 2883; Ashkenazi A. et al. PNAS USA, 1991, vol. 88, pág. 10535; Peppel K. et al. J. Exp. Med., 1991, vol. 174, pág. 1483; Mohler K. M. et al. J. Immunol., 1993, vol. 151, pág. 1548).

45 Con respecto a la inhibición de la acción de TNF o al control de las respuestas inmunes utilizando una proteína de fusión de Ig, se espera que una forma multivalente o multimerizada del dominio extracelular, como un dominio funcional de receptores de TNF, CD2 y CTLA4 en una construcción de fusión de Ig, mejore la eficacia de la construcción de fusión. Cuando una proteína de fusión monomérica (proteína de fusión de cadena pesada) del dominio extracelular del receptor de TNF y la cadena pesada de Ig se expresa en una línea de células simultáneamente con otra proteína de fusión monomérica (proteína de fusión de cadena ligera) del dominio extracelular del receptor de TNF y la cadena ligera de Ig, se produce una proteína de fusión dimerica mediante la interacción entre la cadena pesada y la cadena ligera. La proteína de fusión dimerica tiene dos dominios eficaces dispuestos en paralelo tal como en la forma in vivo, y tiene una eficacia acusadamente incrementada en comparación con construcciones de fusión monoméricas (Scallon B.J. et al. Cytokine, 1995, vol. 7, pág. 759).

55 Sin embargo, una proteína de fusión de Ig de este tipo en una forma dimerica es difícil de industrializar debido a los siguientes problemas: deberían co-introducirse en una célula hospedadora dos genes que estén individualmente fusionados a las cadenas pesada y ligera de Ig; cuando dos proteínas de fusión diferentes son expresadas simultáneamente en una sola célula, sus rendimientos disminuyen grandemente; y debido a que todas las proteínas de fusión de cadena pesada y las proteínas de fusión de cadena ligera expresadas no participan en la formación de dímeros, dímeros que fusionan una proteína de fusión de cadena pesada y una proteína de fusión de cadena ligera

son técnicamente difíciles de aislar a partir de una mezcla con las proteínas de fusión de cadena pesada monoméricas o las proteínas de fusión de cadena ligera.

5 A este respecto, los autores de la presente invención construyeron una proteína concatamérica, en la cual un extremo C del dominio soluble de una proteína biológicamente activa está enlazado a un extremo N del dominio soluble de una proteína biológicamente activa, idéntica o diferente, utilizando tecnología de ADN recombinante. También, los autores de la presente invención prepararon una construcción de ADN que codifica una proteína dimérica, en la que dos moléculas de una proteína monomérica en la que un concatámero de una proteína que participa en una respuesta inmune está enlazado a la región de bisagra de un fragmento Fc de inmunoglobulina, están unidas por disulfuro en la región de bisagra y producen una proteína de fusión dimérica enlazada al concatámero utilizando tecnología de ADN recombinante basada en la construcción de ADN.

15 Tal como se describe antes, se han realizado intentos para mejorar la eficacia y el método de preparación de proteínas de fusión de inmunoglobulina, pero casi todos los esfuerzos han sido incapaces de aumentar la estabilidad de las proteínas de fusión de inmunoglobulina. A este respecto, según se describe en el documento KR 2004 0009997 A1, los autores de la presente invención desarrollaron un método para aumentar la estabilidad de proteínas añadiendo un motivo de glicosilación a una región de conjunción entre un dominio funcional de una proteína y una región Fc de inmunoglobulina. Sin embargo, cuando una inmunoadhesina es glicosilada próxima a un dominio funcional, la proteína no se pliega correctamente o tiene una función reducida.

20 T. Shantha Raju discute en el Artículo *Glycosylation Variations with Expression Systems* (Bio Process International, abril de 2003, pág. 46 y siguientes) la glicosilación de IgG humana. Uno de los tópicos son los cambios debido a variaciones en las condiciones de las células. La maquinaria de glicosilación de líneas de células derivadas de ovarios de hámster chino y de ratón se compara con la maquinaria de glicosilación humana. Sólo se observan ligeras diferencias que no afectan a la calidad del producto.

25 El documento WO 03/010202 A1 describe una proteína de fusión de CTLA4-Ig que consiste en un péptido señal, el dominio extracelular soluble CTLA4 y la región Fc de IgG1, una proteína de fusión CTLA4-CTLA4-Ig Fc concatamérica y una proteína de fusión CTLA4-CTLA4-Ig Fc glicosilada concatamérica. La proteína de fusión CTLA4-CTLA4-Ig Fc glicosilada concatamérica contiene tres sitios de N-glicosilación insertados entre los dos dominios de CTLA4. Esta forma muestra la concentración más elevada en sangre.

#### Descripción de la invención

35 A este respecto, los autores de la presente invención construyeron una proteína de fusión glicosilada introduciendo un motivo de glicosilación adicional en una inmunoglobulina, particularmente una porción Fc de una proteína de fusión de inmunoglobulina, y encontraron que la proteína de fusión glicosilada actúa in vivo durante un período de tiempo más prolongado que la forma que no contiene un motivo de glicosilación, conduciendo con ello a la presente invención.

40 Así, en un aspecto, la presente invención de acuerdo con la reivindicación 1 proporciona una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en M160N, A195N, T243N, E265N, Y299T, F331T y Q346N.

45 En otro aspecto, la presente invención de acuerdo con la reivindicación 2 proporciona un ADN que codifica una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en M160N, A195N, T243N, E265N, Y299T, F331T y Q346N.

50 En un aspecto adicional, la presente invención de acuerdo con la reivindicación 3 proporciona una proteína de fusión glicosilada, formada como resultado del enlace de (a) una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada formando una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr, con (b) al menos una proteína biológicamente activa o una porción de la misma. De acuerdo con todas las reivindicaciones 1, 2 y 3 independientes, la variante de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°s 17, 19, 21 y 23.

60 Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ADN que codifica una proteína de fusión glicosilada, la cual se forma como resultado del enlace de (a) una inmunoglobulina glicosilada o una porción

Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada formando una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr, con (b) al menos una proteína biológicamente activa o una porción de la misma.

5 Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN que codifica una proteína de fusión glicosilada, la cual se forma como resultado del enlace de (a) una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada formando una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr, con (b) al menos una proteína biológicamente activa o una porción de la misma.

10 Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora transfectada o transformada con un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN que codifica una proteína de fusión glicosilada, la cual se forma como resultado del enlace de (a) una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada formando una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr, con (b) al menos una proteína biológicamente activa o una porción de la misma.

15 Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una proteína de fusión glicosilada, que comprende cultivar una célula hospedadora transfectada o transformada con un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN que codifica una proteína de fusión glicosilada, la cual se forma como resultado del enlace de (a) una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada formando una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr, con (b) al menos una proteína biológicamente activa o una porción de la misma, y aislar la proteína de fusión glicosilada a partir del cultivo.

20 Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión glicosilada, la cual se forma como resultado del enlace de (a) una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada formando una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr, con (b) al menos una proteína biológicamente activa o una porción de la misma.

#### 35 Breve descripción de los dibujos

Lo que antecede y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se comprenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada en unión con los dibujos que se acompañan, en los que:

40 La FIG. 1 muestra sitios de glicosilación de inmunoglobulinas de acuerdo con la presente invención:  
 la FIG. 2 es una gráfica que muestra los niveles de expresión de las proteínas de fusión CTLA4-IgG glicosiladas de acuerdo con la presente invención;  
 la FIG. 3 es una gráfica que muestra los resultados de la transferencia Western de proteínas de fusión CTLA4-IgG glicosiladas de acuerdo con la presente invención; y  
 45 la FIG. 4 es una gráfica que muestra los cambios a lo largo del tiempo en niveles en suero de proteínas de fusión CTLA4-IgG glicosiladas de acuerdo con la presente invención, en ratones a los que se les inyectaron por vía intraperitoneal las proteínas de fusión.

#### 50 Mejor modo para llevar a cabo la invención

Letras mayúsculas individuales que representan aminoácidos, tal como se utilizan en esta memoria, representan los siguientes aminoácidos de acuerdo con las abreviaturas convencionales definidas por la Unión Internacional de Bioquímica:

55 A: alanina; B: asparagina o ácido aspártico;  
 C: cisteína; D: ácido aspártico; E: ácido glutámico;  
 F: fenilalanina; G: glicina; H: histidina;  
 I: isoleucina; K: lisina, L: leucina; M: metionina;  
 N: aspargina; P: prolina; Q: glutamina; R: arginina;  
 60 S: serina; T: treonina; V: valina; W: triptófano;

Y: tirosina; y Z: glutamine o ácido glutámico.

La designación "(una mayúscula para un aminoácido) (posición de aminoácido) (una mayúscula para otro aminoácido)", tal como se utiliza en esta memoria, significa que el aminoácido anterior está sustituido con el aminoácido posterior en la posición de aminoácido designada de una proteína dada. Por ejemplo, M179N indica que el residuo metionina en la posición 179<sup>a</sup> de una proteína dada (es decir, IgG) está reemplazada por asparagina. La posición de aminoácidos se numera a partir del extremo N de una proteína de tipo salvaje madura.

El término "glicosilación" significa un proceso mediante el cual proteínas producidas por células eucarióticas en calidad de células hospedadoras son modificadas por la fijación de cadenas de azúcares. Se sabe que la fijación de cadenas de azúcares afecta a las propiedades de proteínas así como a la estabilidad in vivo y a la funcionalidad de las proteínas. Existen dos tipos de glicosilación. La O-glicosilación enlaza una cadena de oligosacáridos a un residuo serina y/o treonina; la N-glicosilación enlaza una cadena de oligosacáridos a un residuo asparagina. En particular, la N-glicosilación se produce en la secuencia de aminoácidos específica, Asn-X-Ser/Thr (X es cualquier aminoácido, excluida prolina).

En la presente invención, una secuencia de ADN que codifica una inmunoglobulina o un fragmento de la misma está mutada en uno o más nucleótidos para formar un sitio de glicosilación adicional en el que se produce la O- o N-glicosilación, y el ADN mutado se expresa en una célula hospedadora para permitir una glicosilación espontánea. En un aspecto, una inmunoglobulina glicosilada o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención se construye mutando una secuencia de ADN que codifica una inmunoglobulina o un fragmento de la misma para añadir y/o aumentar una secuencia Asn-X-Ser/Thr (motivo de glicosilación) en la que se produce una N-glicosilación.

Las "inmunoglobulinas", que son modificadas para poseer un motivo de glicosilación en la presente invención, son moléculas de proteínas que se producen en células B y que sirven como receptores de antígenos que reconocen específicamente una amplia diversidad de antígenos. Las moléculas tienen una estructura en forma de Y que consiste en dos cadenas ligeras (cadenas L) idénticas y en dos cadenas pesadas (cadenas H) idénticas, en que las cuatro cadenas son mantenidas juntas por un cierto número de enlaces disulfuro, incluido el puente disulfuro entre las cadenas H en la región de bisagra. Las cadenas L y H comprenden regiones variables y constantes. De acuerdo con características de las regiones constantes de cadenas H, las inmunoglobulinas (Ig) se clasifican en cinco isotipos, A (IgA), D (IgD), E (IgE), G (IgG) y M (IgM). Los cinco subtipos poseen propiedades estructurales y biológicas únicas. Estas inmunoglobulinas pueden ser todas ellas modificadas de acuerdo con la presente invención.

Dado que una inmunoadhesina contiene generalmente un fragmento de una inmunoglobulina, a saber la porción Fc, un motivo de glicosilación en la presente invención se introduce preferiblemente en la porción Fc de una inmunoglobulina. La expresión "porción Fc de una inmunoglobulina", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un fragmento que no tiene actividad de unión a antígeno y que es fácilmente cristalizada, que comprende una región de bisagra y dominios CH2 y CH3, y una porción que es la responsable de la unión de un anticuerpo a materiales y células efectoras.

En la presente invención, un motivo de glicosilación se crea preferiblemente modificando uno o más residuos aminoácidos en las posiciones 160, 195, 243, 265, 299, 331 y 346 de una inmunoglobulina (todos estos residuos aminoácido están presentes en la porción Fc de una inmunoglobulina). Así, en un aspecto, la presente invención proporciona una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en M160N, A195N, T243N, E265N, Y299T, F331T y Q346N, y un gen que codifica a la misma. En mayor detalle, se proporciona una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1 listada en la Tabla 1, que contiene combinaciones de una o más de las modificaciones de aminoácidos antes mencionadas.

TABLA 1

Inmunoglobulinas glicosiladas o porciones Fc de las mismas de acuerdo con la presente invención

Nombre	Modificación de aminoácidos	SEQ ID NO	
		ADN	Proteína
Ig-G1	M160 N	16	17
Ig-G2	E265N; Y299T	18	19
Ig-G3	Y299T; F331T	20	21
Ig-G4	M160N; E265N; Y299T	22	23
Ig-G5	M160N; E265N; Y299T; F331T	24	25
Ig-G6	M160N; A195N; E265N; Y299T; F331T	26	27
Ig-G7	M160N; A195N; T243N; E265N; Y299T; F331T	28	29
Ig-G8	M160N; A195N; T243N; E265N; Y299T; F331T; Q346N	30	31

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión glicosilada, la cual se forma como resultado del enlace de (a) una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada que forma una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr, con (b) al menos una proteína biológicamente activa o una porción de la misma. En un aspecto preferido, el fragmento de una inmunoglobulina incluye una porción Fc, y la porción de una proteína biológicamente activa incluye un dominio extracelular soluble.

10 En un aspecto, la proteína de fusión glicosilada tiene una estructura monómera en la que se forma un solo polipéptido como resultado del enlace de (a) una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada que forma una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr, con (b) al menos una proteína biológicamente activa o una porción de la misma. La porción de una proteína biológicamente activa incluye preferiblemente un dominio extracelular soluble de la proteína biológicamente activa. Dos moléculas de una proteína de fusión glicosilada monomérica de este tipo se pueden enlazar mediante un enlace disulfuro en la región de bisagra para formar una estructura dímera.

15 En otro aspecto, la proteína de fusión glicosilada tiene una estructura monómera en la que se forma un solo polipéptido como resultado del enlace, en una forma concatamérica, de (a) una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, en la que está adicionalmente glicosilada una variante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada que forma una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr, con (b) una primera proteína biológicamente activa o una porción de la misma, y (c) una segunda proteína biológicamente activa o una porción de la misma. Las primera y segunda proteínas biológicamente activas pueden ser idénticas o diferentes. La porción de una proteína biológicamente activa incluye preferiblemente un dominio extracelular soluble de la proteína biológicamente activa. Dos moléculas de una proteína de fusión glicosilada monomérica de este tipo se pueden enlazar mediante un enlace disulfuro en la región de bisagra para formar una estructura dímera.

20 En un aspecto preferido de la proteína de fusión glicosilada de acuerdo con la presente invención, la variante de inmunoglobulina comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en M160N, A195N, T243N, E265N, Y299T, F331T y Q346N y está glicosilada. En un aspecto más preferido, la variante de inmunoglobulina comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 23, y en el aspecto más preferido, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

25 La expresión "proteína biológicamente activa", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una proteína, péptido o polipéptido que tiene actividades generalmente fisiológicas o farmacéuticas, que conserva una parte de sus actividades nativas después de formar una inmunoadhesina. La expresión "actividad biológica", tal como se utiliza en esta memoria, no está limitada a significar actividades fisiológicas o farmacéuticas. Por ejemplo, algunas inmunoadhesinas, tales como las que contienen una enzima, pueden catalizar una reacción en un disolvente orgánico.

30 Ejemplos no limitantes de la proteína, péptido o polipéptido incluyen hemoglobina, proteínas del suero (p. ej. factores sanguíneos, incluidos factor VII, VIII y factor IX), inmunoglobulina, citoquinas (p. el interleuquinas), interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factores estimulantes de colonias (p. ej. G-CSF y GM-CSF – siglas en inglés), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF – siglas en inglés) y proteínas activantes de fosfolipasa (PLAPs – siglas en inglés). Otras proteínas biológicas o terapéuticas típicas incluyen insulina, proteínas vegetales (p. ej. lectina y

ricina), factor de necrosis tumoral (TNF – siglas en inglés) y sus alelos mutantes, factores de crecimiento (p. ej. factores de crecimiento tisular y factores de crecimiento endotelial tales como TGF $\alpha$  o TGF(3), hormonas (p. ej. hormona estimulante de los folículos, hormona estimulante del tiroides, hormona antidiurética, hormonas concentradoras o dispersantes de pigmentos y hormona paratiroides, hormona liberadora de la hormona luteinizante y sus derivados), calcitonina, péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP – siglas en inglés), encefalina sintética, somatomedina, eritropoyetina, factores de liberación del hipotálamo, prolactina, gonadotropina crónica, agentes activantes de plasminógeno tisular, péptido liberador de hormona del crecimiento (GHRP – siglas en inglés) y factor humoral tímico (THF – siglas en inglés). Algunas proteínas tales como interleuquina, interferón o factor estimulante de colonias se pueden producir en una forma no glicosilada utilizando técnicas recombinantes de ADN. Las proteínas no glicosiladas pueden ser útiles como materiales biológicamente activos en la presente invención.

Además, los materiales biológicamente activos, útiles en la presente invención, incluyen cualquier parte de un polipéptido que tenga bioactividad in vivo. Ejemplos de los materiales biológicamente activos incluyen péptidos o polipéptidos, fragmentos de un anticuerpo, proteínas de unión de cadena sencilla (véase la patente de EE.UU. N<sup>o</sup> 4.946.778), moléculas de unión, incluidos polipéptidos de fusión de anticuerpos o sus fragmentos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y anticuerpos catalíticos. Otros ejemplos de los materiales biológicamente activos incluyen proteínas alergénicas tales como ambrosía, antígeno E, veneno de abeja o alérgeno de ácaros.

Además, el material biológicamente activo, útil en la presente invención, incluye enzimas. Ejemplos de enzimas incluyen enzimas específicas de hidratos de carbono, proteinasas, óxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. En detalle, ejemplos no limitantes de las enzimas incluyen asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina desaminasa, peróxido dismutasa, endotoxinasa, catalasa, quimotripsina, lipasa, uricasa, adenosina defosfatasa, tirosinasa y bilirrubina oxidasa. Ejemplos de las enzimas específicas para hidratos de carbono incluyen glucosa oxidasa, glucodasa, galactosidasa, glucocerebrosidasa y glucouronidasa.

La expresión “dominio extracelular soluble”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una porción expuesta a la región extracelular de una proteína de la membrana integral que penetra en la membrana de la célula que comprende fosfolípidos, en donde la proteína de la membrana integral contiene uno o más dominios de transmembrana constituidos predominantemente por aminoácidos hidrofóbicos. Un dominio extracelular de este tipo comprende principalmente aminoácidos hidrofílicos que están típicamente situados en la superficie de una estructura plegada de una proteína y, así, es soluble en un entorno acuoso. De la mayoría de las proteínas de los receptores en la superficie de la célula, dominios extracelulares sirven para unir ligandos específicos, mientras que dominios intracelulares juegan un importante papel en la transducción de señales.

En un aspecto, la proteína de fusión glicosilada de acuerdo con la presente invención se puede preparar mediante una secuencia de ADN que codifica una inmunoglobulina o un fragmento de la misma que está modificado para que contenga un sitio de glicosilación, y enlazado al mismo, otra secuencia de ADN que codifica una proteína biológicamente activa o una porción de la misma. En otro aspecto, la proteína de fusión glicosilada se puede producir preparando en principio una secuencia de ADN (gen de fusión) que codifica tanto una inmunoglobulina o un fragmento de la misma como una proteína biológicamente activa o una porción de la misma, y mutando el gen de fusión para permitir que la inmunoglobulina o el fragmento de la misma sea glicosilado. Los dos métodos de preparación difieren uno de otro sólo en términos de una secuencia de ADN que sirve como molde y son básicamente idénticos a métodos de preparación conocidos en la técnica de una secuencia de ADN que codifica una variante de proteína. Así, en lo que sigue, la presente invención pretende centrarse en un método de modificación de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma en el que se introduce sustancialmente un motivo de glicosilación.

Una secuencia de ADN que codifica la inmunoglobulina glicosilada o el fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención se pueden preparar de acuerdo con diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a mutagénesis mediada por oligonucleótidos y mutagénesis de casete.

En particular, la secuencia de ADN que codifica la inmunoglobulina glicosilada o el fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención se preparan preferiblemente mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica es bien conocida en la técnica y se describe por Zoller M. et al. (Zoller M. et al. Nuc. Ac. Res. USA, 1982, vol. 10, págs.. 6487-6500). En síntesis, la secuencia de ADN que codifica la inmunoglobulina glicosilada o el fragmento de la misma se puede preparar hibridando un ADN molde (p. ej. un ADN portador de plásmidos que codifica una inmunoglobulina no modificada o nativa o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1) con un oligonucleótido que codifica una modificación deseada. Después de la hibridación, una segunda hebra completa, complementaria al molde de ADN, se puede sintetizar mediante ADN polimerasa, y la

segunda hebra puede codificar la modificación deseada.

Típicamente, oligonucleótidos utilizados en los métodos antes mencionados están constituidos por aproximadamente 25 nucleótidos. Se pueden emplear oligonucleótidos más cortos, pero los oligonucleótidos óptimos, tanto en las regiones de la izquierda como de la derecha de codones modificados, contienen 12 a 15 nucleótidos complementarios a un molde. Estos oligonucleótidos se pueden hibridar eficazmente con un ADN molde. Estos oligonucleótidos se pueden sintetizar por las técnicas conocidas en la técnica (Crea et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, vol. 75, pág. 5765).

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de ADN que codifica una inmunoglobulina o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, que porta una modificación de aminoácido (IgG en la Tabla 1). Esta secuencia de ADN se puede preparar realizando una PCR que utilice ADN que codifica una inmunoglobulina o su fragmento como un molde y oligonucleótidos sintéticos codificadores de la modificación en calidad de cebadores. Los cebadores se hibridan con su ADN de una sola hebra complementario, producido por la desnaturalización de un molde de ADN de doble hebra durante el calentamiento. ADN polimerasa añade nucleótidos al 3'-OH del cebador codificado por la modificación, uno por uno, de una manera complementaria a un molde en la dirección 5' a 3'. La hebra recientemente sintetizada incorpora el cebador codificado por la modificación, proporcionando así un gen que codifica una modificación deseada. La hebra recientemente sintetizada se utiliza como un ADN de molde en la etapa de extensión de la PCR, dando como resultado la amplificación de un gen que codifica la modificación.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de ADN que codifica una inmunoglobulina o una porción Fc de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, que porta dos o más modificaciones de aminoácidos. Cuando dos o más aminoácidos a modificar están distanciados próximos uno con otro en un polipéptido, todas las modificaciones deseadas son codificadas en un oligonucleótido y, por lo tanto, se consiguen simultáneamente. Por lo tanto, una inmunoglobulina modificada o un fragmento de la misma que tiene dos o más modificaciones de aminoácidos se puede preparar por el mismo método al utilizado para preparar la inmunoglobulina mutada o fragmento de la misma que porta una modificación de un nucleótido, exceptuando el uso de oligonucleótidos que contengan dos o más modificaciones de aminoácidos en calidad de cebadores.

Cuando dos o más aminoácidos a modificar están bastante separados (en el caso de que más de 10 aminoácidos estén presentes entre dos aminoácidos a modificar), todas las modificaciones deseadas no pueden ser codificadas en un oligonucleótido. Por lo tanto, deberían introducirse diferentes métodos. Un método consiste en preparar oligonucleótidos individuales para cada una de las modificaciones de aminoácidos. Cuando los oligonucleótidos son apareados simultáneamente para formar un ADN molde una sola hebra, un ADN de una sola hebra secundario, recientemente sintetizado, codifica la totalidad de las modificaciones de aminoácidos deseadas. Otra estrategia utilizada en la presente invención incluye dos experimentos de mutagénesis. En la mutagénesis primaria, utilizando ADN natural en calidad de molde, un oligonucleótido que contiene una modificación de un aminoácido deseada se aparea al molde y, por lo tanto, se produce ADN heterodúplex. En la mutagénesis secundaria, el ADN heterodúplex se utiliza en calidad de molde. El molde porta ya al menos una modificación. Cuando un oligonucleótido que tiene una modificación de aminoácido adicional se aparea al molde, el ADN resultante codifica las modificaciones tanto primaria como secundaria.

La mutagénesis de casete también es un método preferido para la preparación de ADN que codifica la inmunoglobulina glicosilada o fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención. Este método se basa en la técnica descrita por Well J. et al. (Well J. et al. Biochem., 1990, vol. 29, págs.. 8509-8517). Un material de partida es un plásmido (u otro vector) que contiene un gen que codifica una inmunoglobulina o un fragmento de la misma a modificar. La mutagénesis de casete se utiliza preferiblemente cuando un sitio de enzima de restricción específico está presente sólo en una posición a modificar. Sin embargo, esto no es esencial. Si no existe un sitio de enzima de restricción de este tipo, se puede introducir en una posición apropiada de un gen que codifica una inmunoglobulina o un fragmento de la misma mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Después de haber introducido un sitio de la enzima de restricción en el plásmido, el plásmido se lineariza mediante tratamiento con la enzima de restricción. Un oligonucleótido de doble hebra que tiene una secuencia de ADN que contiene una mutación deseada y está situado entre sitios de enzimas de restricción se puede sintetizar utilizando un método común. Las dos hebras se sintetizan individualmente y se hibridan utilizando una técnica común. Un oligonucleótido de doble hebra de este tipo se designa típicamente como "una casete". La casete debería prepararse en forma de poseer extremos 3' y 5' que sean compatibles con los extremos del plásmido linearizado y que, por lo tanto, puedan ser directamente conjugados al plásmido. El plásmido pasa a contener un ADN que codifica una inmunoglobulina deseada o un fragmento de la misma a través del proceso antes mencionado.

Además, la preparación de una secuencia de ADN que codifique una inmunoglobulina o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención se puede conseguir por un método químico. En particular, una secuencia de ADN de este tipo se puede sintetizar por un método químico utilizando un sintetizador de oligonucleótidos. Se prepara un oligonucleótido basado en una secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina glicosilada o un fragmento de la misma y, preferiblemente, seleccionando un codón preferible, utilizando una célula hospedadora que produce una inmunoglobulina glicosilada o un fragmento de la misma.

Con respecto a una secuencia de ADN que codifica una inmunoglobulina glicosilada o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención, la degeneración en el código genético, que significa que un aminoácido es especificado por más de un codón, es bien conocida en la técnica. Así, existe una pluralidad de secuencias de ADN con degeneración que codifican una inmunoglobulina glicosilada o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención, y todas ellas caen dentro del alcance de la presente invención.

Alternativamente, la proteína de fusión glicosilada de acuerdo con la presente invención se puede preparar como sigue. Se prepara una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión (a la que se alude aquí en lo que sigue como "gen de fusión"), y se inserta en un vector que incluye una o más secuencias para el control de la expresión que regulan la expresión del gen de fusión al ser operativamente enlazadas al gen de fusión. Después, un hospedador se transforma o se transfecta con el vector de expresión recombinante resultante. El transformante o transfectante resultante se cultiva en un medio adecuado bajo condiciones adecuadas para la expresión del gen de fusión. A partir del cultivo resultante se recupera una proteína de fusión glicosilada, esencialmente pura, codificada por el gen de fusión.

El término "vector", tal como se utiliza en esta memoria, significa una molécula de ADN que sirve como un vehículo capaz de portar de manera estable genes exógenos a células hospedadoras. Con el fin de que sea útil en la aplicación, un vector debería ser replicable, tener un sistema para introducirse por sí mismo en una célula hospedadora y poseer marcadores seleccionables.

Además, la expresión "vector de expresión recombinante", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una molécula de ADN circular que porta genes exógenos, operativamente enlazados a la misma, a ser expresados en una célula hospedadora. Cuando se introduce en una célula hospedadora, el vector de expresión recombinante tiene la capacidad de replicarse, independientemente del ADN cromosómico del hospedador, a un elevado número de copias y de producir ADN heterogéneo. Tal como se conoce generalmente en la técnica, con el fin de aumentar el nivel de expresión de un gen transfectado en una célula hospedadora, el gen debería ser operativamente enlazado a secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción, funcionales en la célula hospedadora seleccionada como un sistema de expresión. Preferiblemente, las secuencias de regulación de la expresión y los genes exógenos pueden ser portados en un único vector de expresión que contiene marcadores seleccionables y un origen de la replicación. En el caso de que se utilicen células eucarióticas como un sistema de expresión, el vector de expresión debería comprender, además, marcadores de expresión útiles en las células hospedadoras eucarióticas.

Con el fin de expresar la secuencia de ADN (es decir, el gen de fusión) que codifica la proteína de fusión glicosilada de acuerdo con la presente invención, se pueden emplear diversos vectores de expresión. Preferiblemente, dado que una inmunoglobulina o un fragmento de la misma deberían estar glicosilados, deberían utilizarse vectores de expresión adecuados para células hospedadoras eucarióticas. Vectores de expresión útiles para células hospedadoras eucarióticas contienen secuencias para el control de la expresión derivadas, por ejemplo, de SV40, papiloma virus bovino, adenovirus y citomegalovirus. En detalle, ejemplos de los vectores incluyen pCDNA3.1(+)/Hyg (Invitrogen, Carlsbad, Calif., EE.UU.) y pCl-neo (Stratagen, La Jolla, Calif., EE.UU.). Vectores de expresión útiles para levaduras incluyen el plásmido 2 $\mu$  y sus isoformas, vector POT1 (patente de EE.UU. N° 4.931.373) y pPICZ A, B o C (Invitrogen). Vectores de expresión útiles para células de insectos incluyen pVL 941, pBluebac 4.5 y pMelbac (Invitrogen). Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

La expresión "secuencias para el control de la expresión", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a secuencias de nucleótidos necesarias o ventajosas para la expresión del gen de fusión de acuerdo con la presente invención. Cada una de las secuencias de control puede ser nativa o extraña al gen de fusión. Ejemplos no limitantes de las secuencias para el control de la expresión incluyen secuencias conductoras, secuencias de poliadenilación, secuencias de péptidos, promotores, potenciadores o secuencias activadoras situadas aguas arriba, secuencias de péptidos señal y terminadores de la transcripción.

Con el fin de expresar el gen de fusión de la presente invención, cualquiera de las diversas secuencias para el control de la expresión puede insertarse en los vectores de expresión utilizados en la presente invención. Ejemplos

de secuencias para el control de la expresión adecuadas para dirigir la expresión de proteínas en células de mamíferos incluyen SV40 y promotores temprano y tardío de adenovirus, promotor MT-1 (gen metalotioneína), promotor del gen inmediato-temprano de citomegalovirus humano (CMV), promotor del virus del sarcoma de Rouse (RSV) y promotor de ubiquitina C (UbC) humano. Además, con el fin de mejorar los niveles de expresión en células de mamíferos, un intrón sintético se puede insertar en la región 5'-no traducida del gen de fusión. Ejemplos de secuencias para el control de la expresión adecuadas para dirigir la expresión de proteínas en células de insectos incluyen el promotor de polihedrina, promotor P10, promotor del gen retardado-temprano 39K de baculovirus y la secuencia de poliadenilación de SV40. Ejemplos de secuencias para el control de la expresión, adecuadas para dirigir la expresión de proteínas en levaduras, incluyen el promotor del sistema  $\alpha$ -apareante de levaduras, el promotor de la triosa-fosfato isomerasa (TPI) de levaduras y el promotor ADH2-4c. Ejemplos de secuencias para el control de la expresión, adecuadas para dirigir la expresión de proteínas en células fúngicas, incluyen promotor y terminadores de ADH3.

La expresión "operativamente enlazado" se refiere a un estado en el que el gen de fusión de la presente invención está dispuesto con una secuencia control de este tipo en una relación funcional. Es decir, un gen y las secuencias control están enlazados de manera que se induce la expresión del gen cuando una molécula adecuada (p. ej. proteína activadora de la transcripción) se une a la o las secuencias control. Por ejemplo, cuando una pre-secuencia o un conductor secretor facilita la secreción de una proteína madura, se le alude como operativamente enlazado a la secuencia codificadora de la proteína. Un promotor está operativamente enlazado con una secuencia codificadora cuando el mismo regula la transcripción de la secuencia codificadora. Un sitio de unión a ribosoma está operativamente enlazado a una secuencia codificadora cuando está presente en una posición que permite la traducción de la secuencia codificadora. Típicamente, la expresión "operativamente enlazado" significa que secuencias de nucleótidos enlazadas están en contacto una contra. En el caso de una secuencia conductora secretora, la expresión significa que contacta con una secuencia codificadora y está presente dentro de un marco de lectura de la secuencia codificadora. Sin embargo, un potenciador no necesita contactar necesariamente con una secuencia codificadora. El enlace de las secuencias de nucleótidos se puede conseguir mediante ligamiento en sitios de reconocimiento de la enzima de restricción convenientes. En ausencia de sitios de reconocimiento de la enzima de restricción se pueden utilizar adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos los cuales se sintetizan por los métodos convencionales.

Por otra parte, se pueden utilizar células hospedadoras que tengan una elevada eficacia de introducción de ADN extraño y que tengan elevados niveles de expresión de un ADN introducido. En particular, en calidad de una célula hospedadora debería utilizarse una célula eucariótica capaz de glicosilar la proteína de fusión de la presente invención. Ejemplos de células hospedadoras de levaduras adecuadas incluyen cepas de *Saccharomyces* y *Hansenula*. Ejemplos de células hospedadoras fúngicas adecuadas incluyen especies de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Aspergillus*. Ejemplos de células hospedadoras de insectos adecuadas incluyen líneas de células de *Lepidoptera* tales como Sf9 o Sf21. Ejemplos de células hospedadoras de mamíferos adecuadas incluyen líneas de células CHO, líneas de células COS tales como COS1 o COS7, líneas de células animales tales como la línea de células BHK o células de ratón, y células vegetales cultivadas en tejido y células humanas.

El gen de fusión de la presente invención o un vector de expresión recombinante que comprende el mismo se puede introducir en una célula hospedadora por los métodos descritos en guías experimentales básicas (p. ej., Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986)). Los métodos preferidos para esta introducción en esta célula hospedadora incluyen, por ejemplo, transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción viral, carga por raspado, introducción balística e infección.

En el método de preparación de la presente invención, las células hospedadoras se cultivan en un medio nutricio adecuado para la producción de un polipéptido utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden cultivar mediante cultivo en matraz agitado, fermentación a pequeña escala o a gran escala en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan expresar y/o aislar al polipéptido. El cultivo tiene lugar en un medio nutricio adecuado que contiene fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando procesos conocidos en la técnica. Medios adecuados están comercialmente disponibles de suministradores comerciales y se pueden preparar de acuerdo con composiciones publicadas (por ejemplo el catálogo de American Type Culture Collection). Si la proteína de fusión se secreta en el medio nutricio, se puede recuperar directamente del medio. Si la proteína de fusión no se secreta, se puede recuperar de lisados de células.

La proteína de fusión glicosilada de la presente invención se puede recuperar utilizando uno cualquiera de un cierto número de métodos para aislar un polipéptido, los cuales se conocen en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se

puede recuperar del medio nutricio por procesos convencionales que incluyen, pero no se limitan a centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. Además, el polipéptido se puede purificar por una diversidad de procesos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a cromatografía (p. ej. intercambio de iones, afinidad, hidrofobicidad y exclusión por tamaño), electroforesis, solubilidad diferencial (p. ej. precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión glicosilada de acuerdo con la presente invención.

El término "tratamiento" tal como se utiliza en esta memoria se refiere a una curación, supresión o alivio perfecto de enfermedades o trastornos. Por lo tanto, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en esta memoria, significa una cantidad suficiente para conseguir el efecto farmacéutico anterior. En la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con los métodos de formulación, modos de administración, edad del paciente, peso y sexo, gravedad de la enfermedad, dietas, duración de la administración, vías de administración, tasas de excreción y sensibilidad a la respuesta. Los expertos en la técnica pueden determinar y prescribir fácilmente una dosificación capaz de conseguir un tratamiento deseado.

Además, resultará evidente para los expertos en la técnica que las enfermedades a tratar por la composición farmacéutica de la presente invención pueden variar variando el tipo de proteína. Una proteína de fusión CTLA4-Ig glicosilada, como una realización de la presente invención, es aplicable a enfermedades contra las cuales exhibe efectos terapéuticos, inhibiendo la acción de células T, por ejemplo enfermedades autoinmunes tales como artritis o psoriasis, trasplantes de diversos órganos que incluyen trasplantes de la médula ósea, y venas varicosas. También, proteínas de fusión con receptores para diversos factores de crecimiento de células asociadas a cáncer pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer debido a que tienen una eficacia terapéutica mejorada debido a sus efectos de aumentar los niveles en suero de los receptores y factores angiogénicos bloqueantes.

El soporte utilizado en la composición farmacéutica de la presente invención incluye los soportes, adyuvantes y vehículos comúnmente utilizados en el sector farmacéutico que son denominados, en conjunto, "soportes farmacéuticamente aceptables". Soportes farmacéuticamente aceptables no limitantes, útiles en la composición farmacéutica de la presente invención, incluyen resina de intercambio de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero (p. ej. albúmina de suero humana), agentes tampón (p. ej. fosfato de sodio, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados), agua, sales o electrolitos (p. ej. sulfato de protamina, hidrofosfato disódico, hidrofosfato potásico, cloruro sódico y sales de zinc), sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustratos basados en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliarilato, ceras, copolímeros de bloques de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina virgen.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar a través de cualquiera de las vías comunes, si es capaz de alcanzar a un tejido deseado. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía tópica, parenteral, intraocular, transdermal, intrarrectal e intraluminal, y se puede formular en disoluciones, suspensiones y similares. El término "parenteral", tal como se utiliza en esta memoria, incluye subcutáneo, intranasal, intravenoso, intraperitoneal, intramuscular, intra-articular, intrasinovial, intrasternal, intracardial, intratecal, intralesional e inyección intracraneal o técnicas de infusión.

En un aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular como disoluciones acuosas para administración parenteral. Preferiblemente, se puede emplear una disolución tampón adecuada tal como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Suspensiones acuosas para inyección se pueden suplementar con sustancias capaces de aumentar la viscosidad de las suspensiones, que se ejemplifican por carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y dextrano. Además, suspensiones de los componentes activos, tales como suspensión para inyección oleosa, incluyen disolventes o soportes lipofílicos que se ejemplifican por aceites grasos tales como aceite de sésamo, y ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. También se pueden utilizar como vehículos polímeros amino no lipídicos policatiónicos. Opcionalmente, las suspensiones pueden contener estabilizadores o fármacos adecuados para aumentar la solubilidad de los componentes y obtener elevadas concentraciones de los componentes.

La composición farmacéutica de la presente invención se encuentra preferiblemente en forma de un preparado inyectable estéril tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Una suspensión de este tipo se puede formular de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados (p. ej. Tween 80) y agentes de suspensión. Los preparados inyectables estériles también pueden ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable, no tóxico, tal

como una disolución en 1,3-butanodiol. Los vehículos y disolventes aceptables incluyen manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, en calidad de disolvente o medio de suspensión se pueden emplear convenientemente aceites fijados estériles. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijado insípido, incluidos mono- o di-glicéridos sintéticos. Además, en la producción de preparados inyectables se pueden utilizar ácidos grasos tales como ácido oleico y derivados de glicéridos del mismo, tales como los aceites naturales farmacéuticamente aceptables (p. ej. aceite de oliva o aceite de ricino) y, particularmente, derivados polioxietilados de los mismos.

La composición acuosa antes mencionada se esteriliza principalmente mediante filtración utilizando un filtro para separar bacterias, mezclándolo con desinfectantes o en combinación con radiación. La composición esterilizada puede ser endurecida, por ejemplo mediante liofilización, para obtener un producto endurecido, y para el uso práctico, la composición endurecida se disuelve en agua esterilizada o en una disolución diluida esterilizada.

Con el fin de aumentar la estabilidad a la temperatura ambiente, reducir la necesidad de almacenamiento de coste elevado a baja temperatura y prolongar la vida útil, la composición farmacéutica de la presente invención se puede liofilizar. Un procedimiento de liofilización puede comprender las etapas de congelación, primer secado y segundo secado. Después de la congelación, la composición se calienta a presión para evaporar el agua. En la segunda etapa de secado, el agua residual se separa del producto seco.

La dosis eficaz diaria de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es típicamente de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 500 µg por kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 300 µg por kg de peso corporal y lo más preferiblemente de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 200 µg por kg de peso corporal. Resultará evidente para los expertos en la técnica que la cantidad específica de la composición farmacéutica a administrar a un paciente puede variar dependiendo de una pluralidad de factores que incluyen, pero no se limitan a la actividad biológica deseada, los síntomas del paciente y la resistencia a los fármacos.

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes Ejemplos. Resultará evidente para los expertos en la técnica que los siguientes Ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la presente invención, y el alcance de la presente invención no está limitado a los Ejemplos.

## EJEMPLOS

TABLA 2

Información sobre cebadores utilizados en la preparación de CTLA4-Ig		
Nombre del cebador y otros	SEQ ID NO	Descripción
oligo CTLA4-F-EcoRI	1	Contiene el extremo 5' del dominio extracelular soluble de CTLA4 y un sitio EcoRI
oligo CTLA4-R-PstI	2	Contiene el extremo 3' del dominio extracelular soluble de CTLA4 y un sitio PstI
oligo IgG1-F-PstI	3	Contiene el extremo 5' de la región de bisagra de IgG y un sitio PstI
oligo IgG1-R-XbaI	4	Contiene el extremo 3' de IgG y un sitio XbaI
ADN codificador de IgG	5	ADN que codifica IgG de tipo salvaje
proteína IgG	6	Proteína IgG de tipo salvaje
ADN codificador de CTLA4-IgG	7	ADN que codifica una proteína de fusión en la que Fc de IgG está enlazada al dominio extracelular soluble de CTLA4
proteína CTLA4-IgG	8	Proteína de fusión en la que Fc de IgG está enlazada al dominio extracelular soluble de CTLA4

## EJEMPLO 1

## A. Preparación de un fragmento de ADN que codifica el dominio extracelular soluble de CTLA4

Un fragmento de ADN que codifica un dominio extracelular soluble de CTLA4 se preparó mediante PCR utilizando un cebador (SEQ ID NO: 1) que tiene una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción, EcoRI, y una secuencia codificadora de una secuencia conductora de CTLA4, y otro cebador (SEQ ID NO: 2) que tiene una secuencia de reconocimiento PstI y una secuencia antisentido que codifica un extremo 3' del dominio extracelular soluble de CTLA4. Se preparó un molde de ADNc en la PCR mediante reacción en cadena de la polimerasa de

transcripción inversa (RT-PCR – siglas en inglés) utilizando ARNm extraído de células mononucleares (linfocitos T) de adultos sanos. ARNm se aisló utilizando un kit de aislamiento de ARNm Tri-Reagent (MRC, EE.UU). Primeramente,  $2 \times 10^7$  linfocitos T humanos se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2) y se lisaron con 1 ml de Tri-Reagent mediante pipeteado repetitivo. El lisado de células se mezcló con 0,2 ml de cloroformo mediante agitación vigorosa, se dejó reposar a la temperatura ambiente durante 15 min y se centrifugó a 15.000 rpm a 4°C durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 ml, se mezcló con 0,5 ml de isopropanol y se centrifugó a 15.000 rpm a 4°C durante 15 min. Después, el sobrenadante se desechó, el sedimento se lavó con 1 ml de agua destilada triple (TDW – siglas en inglés) tratada con 75% de etanol-25% de DEPC. El tubo se invirtió dos o tres veces y se centrifugó a 15.000 rpm a 4°C durante 15 min. Después de haber separado por completo el sobrenadante, el sedimento de ARN se secó al aire para separar etanol remanente y se disolvió en 50  $\mu$ l de TDW tratada con DEPC.

#### B. Preparación de un fragmento de ADN que codifica la región Fc de IgG1

Un fragmento de ADN que codifica una región de Fc de IgG1 se preparó mediante PCR utilizando un cebador (SEQ ID NO: 3) que tiene una secuencia de reconocimiento PstI y una secuencia codificadora de un extremo 5' de Fc de IgG1, y otro cebador (SEQ ID NO: 4) que tiene una secuencia de reconocimiento XbaI y una secuencia antisentido que codifica un extremo 3' de Fc de IgG1. Un molde de ADNc en la PCR se preparó mediante RT-PCR utilizando ARNm extraído de células de la sangre periférica (linfocitos B) de pacientes que padecían fiebre de origen desconocido, que se encontraban en recuperación. La RT-PCR se llevó a cabo utilizando los mismos reactivos bajo las mismas condiciones que en Ejemplo 1, parte A.

#### C. Preparación de CTLA4-IgG no glicosilada codificadora de un gen

El fragmento de ADN que codifica el dominio extracelular soluble de CTLA4 y el fragmento de ADN que codifica la región Fc de IgG1 se digirieron con PstI y se ligaron utilizando T4 ADN ligasa. El ADN ligado contenía una secuencia conductora para facilitar la secreción de proteínas después de la expresión. El fragmento del gen de fusión, así producido, se digirió con EcoRI y XbaI y se insertó en sitios EcoRI/XbaI de pBluescript KS II(+) (Stratagene, EE.UU.), que es un vector de clonación comercialmente disponible. Toda la región codificadora se identificó mediante secuenciación de ADN (SEQ ID NO: 7). Una proteína de fusión expresada a partir del gen de fusión se designó "CTLA4-IgG", cuya secuencia de aminoácidos predicha se representa por SEQ ID NO: 8

#### EJEMPLO 2: Preparación de proteínas de fusión CTLA4-IgG glicosiladas

Con el fin de introducir un motivo de glicosilación en la región Fc de IgG1, siete cebadores con una secuencia de nucleótidos que contenía una mutación que conducía a una sustitución de un aminoácido, se prepararon como sigue: en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, un codón 478-480 (ATG, Met) se reemplazó por AAC (Asn, N), un codón 583-585 (GCC, Ala) se reemplazó por AAC (Asn, N), un codón 727-729 (ACC, Thr) se reemplazó por AAC (Asn, N), un codón 793-795 (GAG, Glu) se reemplazó por AAC (Asn, N) un codón 895-897 (TAC, Tyr) se reemplazó por ACC (Thr, T), un codón 991-993 (TTC, Phe) se reemplazó por ACC (Thr, T) y un codón 1036-1038 (CAG, Gln) se reemplazó por AAC (Asn, N). La información de estos cebadores se proporciona en la Tabla 3 que figura a continuación.

TABLA 3

Información sobre cebadores utilizados en la preparación de CTLA4-Ig glicosilada		
Nombre del cebador	SEQ ID NO	Descripción
mg-hlgG1-CH2-1	9	Cebador que conduce a una sustitución de N (asparagina) por M (metionina) en la posición 160 de SEQ ID NO. 6
mg-hlgG1-CH2-2	10	Cebador que conduce a una sustitución de N (asparagina) por A (alanina) en la posición 195 de SEQ ID NO. 6
mg-hlgG1-CH2-3	11	Cebador que conduce a una sustitución de N (asparagina) por T (treonina) en la posición 243 de SEQ ID NO. 6
mg-hlgG1-CH3-1	12	Cebador que conduce a una sustitución de N (asparagina) por E (ácido glutámico) en la posición 265 de SEQ ID NO. 6
mg-hlgG1-CH3-2	13	Cebador que conduce a una sustitución de T (treonina) por Y (triptófano) en la posición 299 de SEQ ID NO. 6
mg-hlgG1-CH3-3	14	Cebador que conduce a una sustitución de T (treonina) por F (fenilalanina) en la posición 331 de SEQ ID NO. 6
mg-hlgG1-CH3-4	15	Cebador que conduce a una sustitución de N (asparagina) por Q (glutamina) en la posición 346 de SEQ ID NO. 6

5 Proteínas de fusión glicosiladas de la presente invención se prepararon mediante PCR utilizando el vector de clonación que porta ADN codificador de CTLA4-hlgG, preparado en el Ejemplo 1, en calidad de un molde, y los oligonucleótidos listados en la Tabla 3 en calidad de cebadores.

En detalle, cada una de las proteínas de fusión glicosiladas se preparó como sigue.

- 10 (1) CTLA4-hlgG-G1 (variante G1): se creó un motivo de glicosilación utilizando un cebador (SEQ ID NO: 9) diseñado para que tuviera una secuencia de nucleótidos que contiene una sustitución de AAC (Asn, N) para los nucleótidos 478-480 (ATG, Met) situados en la región Fc de IgG (SEQ ID NO: 5).
- 15 (2) CTLA4-hlgG-G2 (variante G2): se crearon dos motivos de glicosilación utilizando cebadores (SEQ ID NOS: 12 y 13) diseñados para que tuvieran secuencias de nucleótidos que contienen sustituciones de AAC (Asn, N) y ACC (Thr, T) para los nucleótidos 793-795 (GAG, Glu) y los nucleótidos 895-897 (TAC, Tyr), respectivamente, situados en la región Fc de IgG (SEQ ID NO: 5).
- 20 (3) CTLA4-hlgG-G3 (variante G3): se crearon dos motivos de glicosilación utilizando cebadores (SEQ ID NOS: 13 y 14) diseñados para que tuvieran secuencias de nucleótidos que contienen sustituciones de ACC (Thr, T) y ACC (Thr, T) para los nucleótidos 895-897 (TAC, Tyr) y los nucleótidos 991-993 (TTC, Phe), respectivamente, situados en la región Fc de IgG (SEQ ID NO: 5).
- 25 (4) CTLA4-hlgG-G4 (variante G4): se crearon tres motivos de glicosilación utilizando cebadores (SEQ ID NOS: 9, 12 y 13) diseñados para que tuvieran secuencias de nucleótidos que contienen sustituciones de AAC (Asn, N), AAC (Asn, N) y ACC (Thr, T) para los nucleótidos 478-480 (ATG, Met), los nucleótidos 793-795 (GAG, Glu) y los nucleótidos 895-897 (TAC, Tyr), respectivamente, situados en la región Fc de IgG (SEQ ID NO: 5).
- 30 (5) CTLA4-hlgG-G5 (variante G5): se crearon cuatro motivos de glicosilación utilizando cebadores (SEQ ID NOS: 9, 12, 13 y 14) diseñados para que tuvieran secuencias de nucleótidos que contienen sustituciones de AAC (Asn, N), AAC (Asn, N), ACC (Thr, T) y ACC (Thr, T) para los nucleótidos 478-480 (ATG, Met), los nucleótidos 793-795 (GAG, Glu), los nucleótidos 895-897 (TAC, Tyr) y los nucleótidos 991-993 (TTC, Phe), respectivamente, situados en la región Fc de IgG (SEQ ID NO: 5).
- 35 (6) CTLA4-hlgG-G6 (variante G6): se crearon cinco motivos de glicosilación utilizando cebadores (SEQ ID NOS: 9, 10, 12, 13 y 14) diseñados para que tuvieran secuencias de nucleótidos que contienen sustituciones de AAC (Asn, N), AAC (Asn, N), AAC (Asn, N), ACC (Thr, T) y ACC (Thr, T) para los nucleótidos 478-480 (ATG, Met), los nucleótidos 583-585 (GCC, Ala), los nucleótidos 793-795 (GAG, Glu), los nucleótidos 895-897 (TAC, Tyr) y los nucleótidos 991-993 (TTC, Phe), respectivamente, situados en la región Fc de IgG (SEQ ID NO: 5).
- 40 (7) CTLA4-hlgG-G7 (variante G7): se crearon seis motivos de glicosilación utilizando cebadores (SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13 y 14) diseñados para que tuvieran secuencias de nucleótidos que contienen sustituciones de AAC (Asn, N), AAC (Asn, N), AAC (Asn, N), AAC (Asn, N), ACC (Thr, T) y ACC (Thr, T) para los nucleótidos 478-480 (ATG, Met), los nucleótidos 583-585 (GCC, Ala), los nucleótidos 727-729 (ACC, Thr), los nucleótidos 793-795 (GAG, Glu), los nucleótidos 895-897 (TAC, Tyr) y los nucleótidos 991-993 (TTC, Phe), respectivamente, situados en la región Fc de IgG (SEQ ID NO: 5).
- (8) CTLA4-hlgG-G8 (variante G8): se crearon siete motivos de glicosilación utilizando cebadores (SEQ ID

NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15) diseñados para que tuvieran secuencias de nucleótidos que contienen sustituciones de AAC (Asn, N), AAC (Asn, N), AAC (Asn, N), AAC (Asn, N), ACC (Thr, T), ACC (Thr, T) y AAC (Asn, N) para los nucleótidos 478-480 (ATG, Met), los nucleótidos 583-585 (GCC, Ala), los nucleótidos 727-729 (ACC, Thr), los nucleótidos 793-795 (GAG, Glu), los nucleótidos 895-897 (TAC, Tyr), los nucleótidos 991-993 (TTC, Phe) y los nucleótidos 1036-1038 (CAG, Gln), respectivamente, situados en la región Fc de IgG (SEQ ID NO: 5).

La PCR se llevó a cabo como sigue. A un tubo de PCR se añadieron 1 µl de ADN de CTLA4-hlgG (2,2 ng), 1,25 U Pfu de ADN polimerasa (Stratagene, EE.UU.), 4 U Pfu de ADN ligasa (Stratagene, EE. UU.), 1 µl de tampón de reacción 10 x para Pfu ADN ligasa, 1 µl de cada uno de los cebadores (10 pM) y 2 µl de dNTP (en cada caso 10 mM), y se añadió agua destilada triple hasta un volumen final de 20 µl. Las condiciones de la PCR incluían dos ciclos de 3 min a 94°C, 1 min a 61°C y 1 min a 65°C, y luego 29 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 61°C y 7 min a 65°C, seguido de un alargamiento final a 65°C durante 15 min. Los productos de la PCR, así obtenidos, se sometieron a un análisis de la secuencia para determinar si se había insertado con éxito el motivo de glicosilación.

### EJEMPLO 3

#### A. Expresión y purificación de proteínas de fusión CTLA4-IgG glicosiladas

Para expresar proteínas de fusión CTLA4-IgG glicosiladas en células K-1 de ovario de hámster chino (CHO-K1, ATCC CCL-61, ovario, hámster chino *Cricetulus griseus*), ADN del plásmido pBluescript KS II(+) que contenía un gen de fusión CTLA4-hlgG en el que se insertó un motivo de glicosilación se aisló a partir de *E. coli* transformada y se digirió con EcoRI y XbaI. El gen de fusión CTLA4-hlgG, así obtenido, se insertó en sitios EcoRI/XbaI de un vector de expresión animal, pCR™ 3 (Invitrogen, EE.UU.). Los vectores de expresión resultantes se designaron como plásmidos pCT4Ig-G2 a G8. Entre ellos, el vector de expresión recombinante pCT4Ig-G2 se depositó en el Centro de Cultivo de Microorganismos de Corea (KCCM) el 17 de mayo de 2004, bajo las provisiones del Tratado de Budapest y se le asignó el número de acceso KCCM 10572.

#### B. Transfección y evaluación de la expresión de genes de fusión

Células K-1 de ovario de hámster chino (CHO-K1) se extendieron en placas de cultivo de tejido de seis pocillos (Nunc, EE.UU.) a una densidad de  $1-3 \times 10^5$  células por pocillo y se desarrollaron hasta una confluencia de 50-80% en medio DMEM que contenía FBS al 10%. En un DMEM exento de suero, 1-2 µg de ADN de uno cualquiera de los plásmidos pCT4Ig-G2 a G8 se mezclaron con 2-25 µl de lipofectamina (Gibco, BRL, EE.UU.) y se incubaron a la temperatura ambiente durante 15-45 min para formar complejos de ADN-liposoma. Después, el complejo resultante se añadió a placas de seis pocillos. Después de un período de incubación de 5 h, las células se volvieron a alimentar con medio DMEM que contenía FBS al 20% y se cultivaron ulteriormente durante 18-24 h. Después de ello, las células se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10%, suplementado con 3 mg/ml de geneticina (G418, Gibco BRL, EE.UU.) durante tres semanas. Las colonias formadas se seleccionaron y aislaron y luego se propagaron.

El que se expresara o no un gen de fusión se evaluó mediante ELISA utilizando IgG anti-humana de cabra marcada con peroxidasa (KPL, EE.UU.). El ELISA se llevó a cabo como sigue: primero 1 mg/ml de IgG anti-humana de cabra se diluyó a razón de 1:2000 con bicarbonato de sodio 0,1 M, y 100 µl del diluyente se añadieron en partes alícuotas a una placa flexible de 96 pocillos (Falcon, EE.UU.). Después de sellar con una película de plástico, la placa se incubó a 4°C a lo largo de 16 h para permitir que el fondo de la placa quedara recubierto con el anticuerpo. Después, la placa se lavó tres veces con un tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 1x Tween 20 al 0,1%) y a cada uno de los pocillos se añadieron 100 µl de un tampón de dilución (48,5 ml de 1x PBS, 1,5 ml de FBS, 50 µl de Tween-20). 20 µl de un sobrenadante del cultivo se añadieron al primer pocillo y se diluyó en serie utilizando una micropipeta. 0,01 µg/ µl de IgG humana (Sigma, EE.UU.) en calidad de un testigo positivo y un fluido de cultivo de células CHO-K1 no transfectadas como un testigo negativo también se diluyeron al igual que la muestra de ensayo. Después de haberse completado las diluciones, la placa flexible de 96 pocillos (Falcon, EE.UU.) se envolvió con una lámina, se incubó a 37°C durante 1 h 30 min y se lavó tres veces con el tampón de lavado. IgG anti-humana de cabra marcada con peroxidasa (KPL, EE.UU.) se diluyó a razón de 1:5000 con el tampón diluyente, y a cada uno de los pocillos se añadieron 100 µl del diluyente, se envolvieron con una lámina y se incubaron a 37°C durante una hora. Después de completarse la reacción, la placa se desarrolló con un sistema de sustrato de peroxidasa de micropocillo TMB (KPL, EE.UU.). La absorbancia se midió a 630 nm utilizando un lector de microplacas (Bio-RAD, modelo 550, Japón) para determinar si se expresaba un gen de fusión y los niveles de expresión del gen de fusión (FIG. 2).

Tal como se muestra en la FIG. 2, la variante G1 se expresó a los niveles más elevados, seguido de las variantes G2, G4, G0 y G3. Se encontró que las variantes G5, G6, G7 y G8 raramente se expresaban.

#### EJEMPLO 4

5

##### A. Análisis de transferencia Western

Una proteína expresada se purificó mediante inmunoprecipitación y se sometió a transferencia Western. Primeramente, 50  $\mu$ l de perlas de proteína A-Sepharose se colocaron en un tubo de 1,5 ml, se mezclaron con 100  $\mu$ l de tampón A (ácido bórico 0,05 M, NaCl 4 M, pH 9,0) y se centrifugaron a 13.000 rpm durante aproximadamente 10 s. Después de desechar el sobrenadante, esta etapa se repitió tres veces. Cada una de las muestras de proteína se mezcló con las perlas de proteína A-Sepharose equilibrada y se incubó a 4°C durante 3 h con rotación para inducir la unión. Después, la mezcla de reacción se centrifugó a 13.000 rpm y las perlas se lavaron tres veces con tampón A. Las perlas se mezclaron con 20  $\mu$ l de tampón B (fosfato de sodio 0,05 M, ácido cítrico 0,05 M, NaCl 0,3 M, pH 3,0) y se centrifugaron a 13.000 rpm para eluir las proteínas ligadas. La muestra de proteínas eluida se mezcló con tampón 5x que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, se hirvió durante 5 min y se sometió a SDS-PAGE reducida. En calidad de un gel de apilamiento se utilizó un gel de acrilamida al 3,5% (Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), SDS al 0,4%) y como gel energético se utilizó un gel de acrilamida al 10% (Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), SDS al 0,4%). Después de la electroforesis, las proteínas se electro-transfirieron a una membrana Westran de 0,4  $\mu$ m (membrana de transferencia de PVDF, S&S) durante 2 h a 350 mA. El borrón se bloqueó con leche desnatada al 5% durante 1 h. Después de lavar tres veces con tampón de lavado (Tween-20 al 0,1%, solución salina tamponada con fosfato 1x) el borrón se incubó en una dilución 1:2000 de IgG anti-humana de cabra tratada con peroxidasa (KPL, EE.UU.) durante 1 h. El borrón se lavó tres veces con tampón de lavado y se desarrolló a la temperatura ambiente durante 10 min con 15 ml de un agente colorante, que se preparó de acuerdo con un método de uso recomendado utilizando un kit de sustrato DAB (VECTOR LABORATORIES, EE.UU.). La reacción se terminó con agua destilada triple. Los resultados se proporcionan en la FIG. 3.

#### EJEMPLO 5: Medición de semi-vidas en suero de proteínas de fusión CTLA4-hIgG glicosiladas en ratones

Semi-vidas en suero de proteínas de fusión CTLA4-hIgG glicosiladas se midieron en ratones como sigue. Cada una de las proteínas de fusión se inyectó por vía intraperitoneal en ratones (ICR, Samtako, Inc., Corea) en una dosis de 0,2 mg/kg. Muestras de sangre se recogieron a intervalos de tiempo dados durante un mínimo de 50 h y las concentraciones de proteínas se determinaron de acuerdo con el mismo proceso ELISA que en el Ejemplo 3 (FIG. 4).

Tal como se muestra en la FIG. 4, las variantes G2, G3 y G4 tenían niveles en suero incrementados, mientras que la variante G1 exhibía un tiempo de circulación en sangre reducido en comparación con el tipo salvaje. En particular, la variante G2 exhibía el tiempo de circulación más elevado.

#### Aplicabilidad industrial

Tal como se describe antes en esta memoria, las proteínas de fusión glicosiladas de acuerdo con la presente invención son capaces de reducir la dosificación y la frecuencia de administración en aplicaciones clínicas, ya que tienen una elevada estabilidad in vivo.

45

Listado de Secuencias

5	<110>	MEDEXGEN linc. CHUNG, Yong-Hoon YI, Ki-Wan CHO, Hoon-Sik Park, Hong-Gyu KIM, Kwang-Seong	
10	<120>	Inmunoglobulina glicosilada e inmunoadesina que la comprende	
	<130>	P052MED03PCT	
15	<150>	KR-10-2004-0038833	
	<151>	31-05-2004	
	<160>	31	
20	<170>	KopatentIn 1,71	
	<210>	1	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
25	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	cebador, oligo CTLA4-F-EcoRI	
	<400>	1	
30		<b>ccggaattca tgaggacctg gcc</b>	24
	<210>	2	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
35	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	cebador, oligo CTLA4-R-PstI	
40	<400>	2	
		<b>ctctgcagaa tctgggcacg gttcaggatc</b>	30
	<210>	3	
45	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	cebador, oligo IgG1-F-PstI	
50	<400>	3	
		<b>atctgcagag cccaaatctt gtgac</b>	25
	<210>	4	
55	<211>	34	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	

ES 2 428 894 T3

<220>  
<223> cebador, oligo IgG1-R-Xbal  
  
<400> 4  
5 gctctagagc tcatttaccg ggagacaggg agag 34  
  
<210> 5  
<211> 1068  
10 <212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<220>  
<221> CDS  
15 <222> (1)...(1065)  
<223> IgG-salvaje  
  
<400> 5

ES 2 428 894 T3

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

ES 2 428 894 T3

145	150	155	160	
atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac				528
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His				
	165	170	175	
gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg				576
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val				
	180	185	190	
cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac				624
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr				
	195	200	205	
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc				672
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly				
	210	215	220	
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc				720
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile				
	225	230	235	240
gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg				768
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val				
	245	250	255	
tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc				816
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser				
	260	265	270	
ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag				864
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu				
	275	280	285	
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc				912
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro				
	290	295	300	
gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg				960
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val				

ES 2 428 894 T3

305	310	315	320	
gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg				1008
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met				
	325	330	335	
cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc				1056
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser				
	340	345	350	
ccg ggt aaa tga				1068
Pro Gly Lys				
	355			

5 <210> 6  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
 20 25 30  
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser

ES 2 428 894 T3

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

ES 2 428 894 T3

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 325 330 335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 340 345 350

Pro Gly Lys  
 355

5 <210> 7  
 <211> 1071  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(1068)  
 <223> CTLA4-IgG

<400> 7  
 atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc 48  
 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile  
 1 5 10 15  
 gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc 96  
 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val  
 20 25 30  
 cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt 144  
 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys  
 35 40 45  
 gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc 192  
 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser  
 50 55 60  
 atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa 240

15

ES 2 428 894 T3

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

ES 2 428 894 T3

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 225 230 235 240

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag 768  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 245 250 255

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc 816  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
 260 265 270

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg 864  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 275 280 285

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct 912  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 290 295 300

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc 960  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 305 310 315 320

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg 1008  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 325 330 335

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg 1056  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 340 345 350

tcg ccg ggt aaa tg a 1071  
 Ser Pro Gly Lys  
 355

<210> 8  
 <211> 356  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

ES 2 428 894 T3

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile  
1                                5                                10                                15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val  
                              20                                25                                30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys  
                              35                                40                                45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser  
                              50                                55                                60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln  
65                                70                                75                                80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu  
                              85                                90                                95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile  
                              100                                105                                110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Ala Glu Pro Lys Ser  
                              115                                120                                125

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
130                                135                                140

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
145                                150                                155                                160

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
                              165                                170                                175

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
                              180                                185                                190

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
                              195                                200                                205

ES 2 428 894 T3

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 210 215 220

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 225 230 235 240

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 245 250 255

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
 260 265 270

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 275 280 285

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 290 295 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 305 310 315 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 325 330 335

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 340 345 350

Ser Pro Gly Lys  
 355

5 <210> 9  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> cebador, mg-hlgG1-CH2-1

<400> 9  
 tccgggagat gttgagggtg tccttg

15 <210> 10  
 <211> 25  
 <212> ADN

26

	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	cebador, mg-hlgG1-CH2-2	
5	<400>	10	
		<b>gctttgtctt gttattatgc acctc</b>	25
	<210>	11	
10	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	cebador, mg-hlgG1-CH2-3	
	<400>	11	
		<b>ctttggagat gtttttctcg atggg</b>	25
20	<210>	12	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
25	<220>		
	<223>	cebador, mg-hlgG1-CH3-1	
	<400>	12	
		<b>tcttggtcag gttatcccgg gatgg</b>	25
30	<210>	13	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
35	<220>		
	<223>	cebador, mg-hlgG1-CH3-2	
	<400>	13	
40		<b>gcgtggtctt ggtgttgttc tccgg</b>	25
	<210>	14	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
45	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	cebador, mg-hlgG1-CH3-3	
50	<400>	14	
		<b>cggagcatga ggtgacgttc ccctg</b>	25
	<210>	15	
	<211>	26	
55	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	

ES 2 428 894 T3

<220>  
 <223> cebador, mg-hlgG1-CH3-4  
 <400> 15  
 5 agaggctctt gttcgtgtag tggttg 26  
 <210> 16  
 <211> 1068  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(1065)  
 15 <223> Ig-G1  
 <400> 16  
 cag atc acc ttg aag gag tct ggt ccc acg ctg gtg aaa ccc aca cag 48  
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 acc ctc acg ctg acc tgc acg ttc tct gga ttc tca ctc agc aaa agt 96  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
 20 25 30  
 gga gtg ggt gtg ggc tgg atc cgt cag ccc cca gga cag gcc ctg gag 144  
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
 35 40 45  
 tgg ctt gca ctc att ttt tgg gat gat gat aag cgc tac agc cca tct 192  
 Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60  
 ctg agg acc aga ctc acc atc acc aag gac acc tcc aaa aac cag gtg 240  
 Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 gtc ctt aca atg acc aac gtg gac cct gcg gac aca gcc aca tat tat 288  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 tgt gga tac agt gtt gaa gga tat ggc caa ggt tac cgc ttt cac tcc 336

20

ES 2 428 894 T3

Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser	
100 105 110	
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tgc tca gag ccc aaa tct tgt	384
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys	
115 120 125	
gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg	432
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
130 135 140	
gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc aac	480
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asn	
145 150 155 160	
atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac	528
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
165 170 175	
gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg	576
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
180 185 190	
cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac	624
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
195 200 205	
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc	672
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
210 215 220	
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc	720
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	
225 230 235 240	
gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg	768
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
245 250 255	
tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc	816

ES 2 428 894 T3

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
                   260                  265                  270

ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag          864  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
                   275                  280                  285

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc          912  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
                   290                  295                  300

gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg          960  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 305                  310                  315                  320

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg          1008  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
                   325                  330                  335

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc          1056  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                   340                  345                  350

ccg ggt aaa          tga  1068  
 Pro Gly Lys  
                   355

<210>          17  
 <211>          355  
 5 <212>          PRT  
    <213>          Homo sapiens

<400>          17

10 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
     1                  5                  10                  15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
                   20                  25                  30

ES 2 428 894 T3

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

ES 2 428 894 T3

	245		250		255
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser					
	260		265		270
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu					
	275		280		285
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro					
	290		295		300
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val					
	305		310		315
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met					
		325		330	335
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser					
	340		345		350
Pro Gly Lys					
	355				

5 <210> 18  
 <211> 1068  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(1065)  
 <223> Ig-G1

15 <400> 18

cag atc acc ttg aag gag tct ggt ccc acg ctg gtg aaa ccc aca cag 48  
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

20

ES 2 428 894 T3

acc ctc acg ctg acc tgc acg ttc tct gga ttc tca ctc agc aaa agt	96
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser	
20 25 30	
gga gtg ggt gtg ggc tgg atc cgt cag ccc cca gga cag gcc ctg gag	144
Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu	
35 40 45	
tgg ctt gca ctc att ttt tgg gat gat gat aag cgc tac agc cca tct	192
Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser	
50 55 60	
ctg agg acc aga ctc acc atc acc aag gac acc tcc aaa aac cag gtg	240
Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val	
65 70 75 80	
gtc ctt aca atg acc aac gtg gac cct gcg gac aca gcc aca tat tat	288
Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt gga tac agt gtt gaa gga tat ggc caa ggt tac cgc ttt cac tcc	336
Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser	
100 105 110	
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tgc tca gag ccc aaa tct tgt	384
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys	
115 120 125	
gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg	432
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
130 135 140	
gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg	480
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	
145 150 155 160	
atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac	528
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
165 170 175	

ES 2 428 894 T3

gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 180 185 190	576
cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr 195 200 205	624
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly 210 215 220	672
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 225 230 235 240	720
gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 245 250 255	768
tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat aac ctg acc aag aac cag gtc agc Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser 260 265 270	816
ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu 275 280 285	864
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac acc aag acc acg cct ccc Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro 290 295 300	912
gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val 305 310 315 320	960
gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met 325 330 335	1008

ES 2 428 894 T3

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc 1056  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 340 345 350

ccg ggt aaa tga 1068  
 Pro Gly Lys  
 355

5 <210> 19  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 10 <400> 19

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
 20 25 30

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60

Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys  
 115 120 125

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

ES 2 428 894 T3

130	135	140
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
145	150	155 160
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	165	170 175
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	180	185 190
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
	195	200 205
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	210	215 220
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
225	230	235 240
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	245	250 255
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	260	265 270
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
	275	280 285
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro		
	290	295 300
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
305	310	315 320
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	325	330 335
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	340	345 350

ES 2 428 894 T3

Pro Gly Lys  
355

5 <210> 20  
<211> 1068  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

10 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)...(1065)  
<223> Ig-G3

<400> 20

15

cag atc acc ttg aag gag tct ggt ccc acg ctg gtg aaa ccc aca cag 48  
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

acc ctc acg ctg acc tgc acg ttc tct gga ttc tca ctc agc aaa agt 96  
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
20 25 30

gga gtg ggt gtg ggc tgg atc cgt cag ccc cca gga cag gcc ctg gag 144  
Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
35 40 45

tgg ctt gca ctc att ttt tgg gat gat gat aag cgc tac agc cca tct 192  
Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
50 55 60

ctg agg acc aga ctc acc atc acc aag gac acc tcc aaa aac cag gtg 240  
Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
65 70 75 80

gtc ctt aca atg acc aac gtg gac cct gcg gac aca gcc aca tat tat 288  
Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

20

25

ES 2 428 894 T3

tgt gga tac agt gtt gaa gga tat ggc caa ggt tac cgc ttt cac tcc	336
Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser	
100                                  105                                  110	
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tgc tca gag ccc aaa tct tgt	384
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys	
115                                  120                                  125	
gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg	432
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
130                                  135                                  140	
gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg	480
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	
145                                  150                                  155                                  160	
atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac	528
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
165                                  170                                  175	
gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg	576
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
180                                  185                                  190	
cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac	624
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
195                                  200                                  205	
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc	672
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
210                                  215                                  220	
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc	720
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	
225                                  230                                  235                                  240	
gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg	768
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
245                                  250                                  255	

ES 2 428 894 T3

tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc 816  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
                   260                                  265                                  270

ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag 864  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
                   275                                  280                                  285

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac acc aag acc acg cct ccc 912  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro  
                   290                                  295                                  300

gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg 960  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 305                                  310                                  315                                  320

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc acc tca tgc tcc gtg atg 1008  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met  
                                   325                                  330                                  335

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc 1056  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                                   340                                  345                                  350

ccg ggt aaa tga 1068  
 Pro Gly Lys  
                   355

<210> 21  
 <211> 355  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Glr  
 1                                  5                                  10                                  15

10 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser

15

ES 2 428 894 T3

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

ES 2 428 894 T3

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 260 265 270

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 275 280 285

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro  
 290 295 300

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 305 310 315 320

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met  
 325 330 335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 340 345 350

Pro Gly Lys  
 355

- <210> 22
- <211> 1068
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)...(1065)
- <223> Ig-G4
- <400> 22

cag atc acc ttg aag gag tct ggt ccc acg ctg gtg aaa ccc aca cag  
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln

48

15

20

ES 2 428 894 T3

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

ES 2 428 894 T3

165	170	175	
gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg			576
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
180	185	190	
cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac			624
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
195	200	205	
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc			672
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
210	215	220	
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc			720
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
225	230	235	240
gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg			768
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
245	250	255	
tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat aac ctg acc aag aac cag gtc agc			816
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
260	265	270	
ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag			864
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
275	280	285	
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac acc aag acc acg cct ccc			912
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro			
290	295	300	
gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg			960
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
305	310	315	320
gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg			1008
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			

# ES 2 428 894 T3

325                                 330                                 335

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc                 1056  
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
              340                                 345                                 350

ccg ggt aaa        tga   1068  
Pro Gly Lys  
              355

5         <210>             23  
          <211>             355  
          <212>             PRT  
          <213>             Homo sapiens

<400>             23

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
  1                                 5                                 10                                 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
                  20                                 25                                 30

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
          35                                 40                                 45

Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
  50                                 55                                 60

Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
  65                                 70                                 75                                 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                  85                                 90                                 95

Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser  
                  100                                 105                                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys  
          115                                 120                                 125

10

ES 2 428 894 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asn  
 145 150 155 160

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 165 170 175

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 180 185 190

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 195 200 205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 210 215 220

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 225 230 235 240

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 260 265 270

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 275 280 285

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro  
 290 295 300

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 305 310 315 320

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 325 330 335

ES 2 428 894 T3

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 340 345 350

Pro Gly Lys  
 355

5 <210> 24  
 <211> 1068  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(1065)  
 <223> Ig-G5

15 <400> 24

cag atc acc ttg aag gag tct ggt ccc acg ctg gtg aaa ccc aca cag 48  
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

acc ctc acg ctg acc tgc acg ttc tct gga ttc tca ctc agc aaa agt 96  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
 20 25 30

gga gtg ggt gtg ggc tgg atc cgt cag ccc cca gga cag gcc ctg gag 144  
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
 35 40 45

tgg ctt gca ctc att ttt tgg gat gat gat aag cgc tac agc cca tct 192  
 Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60

ctg agg acc aga ctc acc atc acc aag gac acc tcc aaa aac cag gtg 240  
 Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

gtc ctt aca atg acc aac gtg gac cct gcg gac aca gcc aca tat tat 288

ES 2 428 894 T3

Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Val	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr		
				85					90					95			
tgt	gga	tac	agt	ggt	gaa	gga	tat	ggc	caa	ggg	tac	cgc	ttt	cac	tcc		336
Cys	Gly	Tyr	Ser	Val	Glu	Gly	Tyr	Gly	Gln	Gly	Tyr	Arg	Phe	His	Ser		
			100					105					110				
tgg	ggc	cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tgc	tca	gag	ccc	aaa	tct	tgt		384
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Cys	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys		
			115					120					125				
gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg		432
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly		
			130					135					140				
gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	aac		480
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Asn		
			145			150				155					160		
atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac		528
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His		
					165					170					175		
gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg		576
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val		
				180					185					190			
cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac		624
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr		
				195				200					205				
cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc		672
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		
			210					215					220				
aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc		720
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile		
			225				230			235					240		
gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg		768

ES 2 428 894 T3

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

tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat aac ctg acc aag aac cag gtc agc 816  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 260 265 270

ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag 864  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 275 280 285

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac acc aag acc acg cct ccc 912  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro  
 290 295 300

gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg 960  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 305 310 315 320

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc acc tca tgc tcc gtg atg 1008  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met  
 325 330 335

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc 1056  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 340 345 350

ccg ggt aaa tga 1068  
 Pro Gly Lys  
 355

- <210> 25
- <211> 355
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 25

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 10 1 5 10 15

15

ES 2 428 894 T3

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
 20 25 30

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60

Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys  
 115 120 125

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asn  
 145 150 155 160

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 165 170 175

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 180 185 190

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 195 200 205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 210 215 220

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 225 230 235 240

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 260 265 270

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 275 280 285

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro  
 290 295 300

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 305 310 315 320

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met  
 325 330 335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 340 345 350

Pro Gly Lys  
 355

- <210> 26
- <211> 1068
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)...(1065)
- <223> Ig-G6
- <400> 26

ES 2 428 894 T3

cag atc acc ttg aag gag tct ggt ccc acg ctg gtg aaa ccc aca cag 48  
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

acc ctc acg ctg acc tgc acg ttc tct gga ttc tca ctc agc aaa agt 96  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
 20 25 30

gga gtg ggt gtg ggc tgg atc cgt cag ccc cca gga cag gcc ctg gag 144  
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
 35 40 45

tgg ctt gca ctc att ttt tgg gat gat gat aag cgc tac agc cca tct 192  
 Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60

ctg agg acc aga ctc acc atc acc aag gac acc tcc aaa aac cag gtg 240  
 Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

gtc ctt aca atg acc aac gtg gac cct gcg gac aca gcc aca tat tat 288  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

tgt gga tac agt gtt gaa gga tat ggc caa ggt tac cgc ttt cac tcc 336  
 Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser  
 100 105 110

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tgc tca gag ccc aaa tct tgt 384  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys  
 115 120 125

gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg 432  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 130 135 140

gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctg aac 480  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asn  
 145 150 155 160

ES 2 428 894 T3

atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 165 170 175	528
gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 180 185 190	576
cat aat aac aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac His Asn Asn Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr 195 200 205	624
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly 210 215 220	672
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 225 230 235 240	720
gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 245 250 255	768
tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat aac ctg acc aag aac cag gtc agc Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser 260 265 270	816
ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu 275 280 285	864
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac acc aag acc acg cct ccc Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro 290 295 300	912
gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val 305 310 315 320	960

ES 2 428 894 T3

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc acc tca tgc tcc gtg atg 1008  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met  
 325 330 335

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc 1056  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 340 345 350

ccg ggt aaa tga 1068  
 Pro Gly Lys  
 355

- <210> 27
- <211> 355
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 27

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
 20 25 30

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60

Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser  
 100 105 110

10

ES 2 428 894 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys  
 115 120 125

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asn  
 145 150 155 160

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 165 170 175

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 180 185 190

His Asn Asn Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 195 200 205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 210 215 220

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 225 230 235 240

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 260 265 270

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 275 280 285

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro  
 290 295 300

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 305 310 315 320

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met

325

330

335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 340 345 350

Pro Gly Lys  
 355

- <210> 28
- <211> 1068
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)...(1065)
- <223> Ig-G7
- <400> 28

15  
 cag atc acc ttg aag gag tct ggt ccc acg ctg gtg aaa ccc aca cag 48  
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

acc ctc acg ctg acc tgc acg ttc tct gga ttc tca ctc agc aaa agt 96  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
 20 25 30

gga gtg ggt gtg ggc tgg atc cgt cag ccc cca gga cag gcc ctg gag 144  
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
 35 40 45

tgg ctt gca ctc att ttt tgg gat gat gat aag cgc tac agc cca tct 192  
 Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60

ctg agg acc aga ctc acc atc acc aag gac acc tcc aaa aac cag gtg 240  
 Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

ES 2 428 894 T3

gtc ctt aca atg acc aac gtg gac cct gcg gac aca gcc aca tat tat	288
Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt gga tac agt gtt gaa gga tat ggc caa ggt tac cgc ttt cac tcc	336
Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser	
100 105 110	
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tgc tca gag ccc aaa tct tgt	384
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys	
115 120 125	
gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg	432
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
130 135 140	
gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc aac	480
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asn	
145 150 155 160	
atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac	528
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
165 170 175	
gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg	576
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
180 185 190	
cat aat aac aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac	624
His Asn Asn Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
195 200 205	
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc	672
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
210 215 220	
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc	720
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	
225 230 235 240	

ES 2 428 894 T3

gag aaa aac atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg	768
Glu Lys Asn Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
245 250 255	
tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat aac ctg acc aag aac cag gtc agc	816
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	
260 265 270	
ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag	864
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	
275 280 285	
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac acc aag acc acg cct ccc	912
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro	
290 295 300	
gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg	960
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	
305 310 315 320	
gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc acc tca tgc tcc gtg atg	1008
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met	
325 330 335	
cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc	1056
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	
340 345 350	
ccg ggt aaa tga	1068
Pro Gly Lys	
355	

5	<210>	29
	<211>	355
	<212>	PRT
	<213>	Homo sapiens
10	<400>	29

15

ES 2 428 894 T3

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1                    5                    10                    15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
                   20                    25                    30

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
                   35                    40                    45

Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
                   50                    55                    60

Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
                   65                    70                    75                    80

Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                   85                    90                    95

Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser  
                   100                    105                    110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys  
                   115                    120                    125

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
                   130                    135                    140

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asn  
                   145                    150                    155                    160

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                   165                    170                    175

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                   180                    185                    190

His Asn Asn Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
                   195                    200                    205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

ES 2 428 894 T3

```
210          215          220

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
225          230          235          240

Glu Lys Asn Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
          245          250          255

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
          260          265          270

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
          275          280          285

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro
          290          295          300

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
305          310          315          320

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met
          325          330          335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
          340          345          350

Pro Gly Lys
          355
```

- 5 <210> 30
- <211> 1068
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
  
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)...(1065)
- <223> Ig-G8
  
- 15 <400> 30

ES 2 428 894 T3

cag atc acc ttg aag gag tct ggt ccc acg ctg gtg aaa ccc aca cag 48  
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

acc ctc acg ctg acc tgc acg ttc tct gga ttc tca ctc agc aaa agt 96  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
 20 25 30

gga gtg ggt gtg ggc tgg atc cgt cag ccc cca gga cag gcc ctg gag 144  
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
 35 40 45

tgg ctt gca ctc att ttt tgg gat gat gat aag cgc tac agc cca tct 192  
 Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60

ctg agg acc aga ctc acc atc acc aag gac acc tcc aaa aac cag gtg 240  
 Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

gtc ctt aca atg acc aac gtg gac cct gcg gac aca gcc aca tat tat 288  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

tgt gga tac agt gtt gaa gga tat ggc caa ggt tac cgc ttt cac tcc 336  
 Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser  
 100 105 110

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tgc tca gag ccc aaa tct tgt 384  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Glu Pro Lys Ser Cys  
 115 120 125

gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg 432  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 130 135 140

gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc aac 480  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asn

ES 2 428 894 T3

145	150	155	160	
atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc cac				528
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His				
	165	170	175	
gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg				576
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val				
	180	185	190	
cat aat aac aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac				624
His Asn Asn Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr				
	195	200	205	
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc				672
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly				
	210	215	220	
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc				720
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile				
225	230	235	240	
gag aaa aac atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg				768
Glu Lys Asn Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val				
	245	250	255	
tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat aac ctg acc aag aac cag gtc agc				816
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser				
	260	265	270	
ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag				864
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu				
	275	280	285	
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac acc aag acc acg cct ccc				912
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lys Thr Thr Pro Pro				
	290	295	300	
gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg				960
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val				

ES 2 428 894 T3

305                    310                    315                    320

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc acc tca tgc tcc gtg atg            1008  
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met  
                              325                    330                    335

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg aac aag agc ctc tcc ctg tcc            1056  
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Asn Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                              340                    345                    350

ccg ggt aaa        tga    1068  
Pro Gly Lys  
                              355

5 <210>        31  
   <211>        355  
   <212>        PRT  
   <213>        Homo sapiens

10 <400>        31

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
   1                    5                    10                    15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
                              20                    25                    30

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Ala Leu Glu  
                              35                    40                    45

Trp Leu Ala Leu Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
   50                    55                    60

Leu Arg Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
   65                    70                    75                    80

Val Leu Thr Met Thr Asn Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                              85                    90                    95

Cys Gly Tyr Ser Val Glu Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe His Ser

ES 2 428 894 T3

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

ES 2 428 894 T3

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met  
325 330 335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Asn Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
340 345 350

Pro Gly Lys  
355

## REIVINDICACIONES

- 1.- Una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma, en la que una variante de inmunoglobulina, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en M160N, A195N, T243N, E265N, Y299T, F331T y Q346N está glicosilada adicionalmente mediante modificación de un residuo aminoácido, caracterizada por que:  
 5 la variante de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs 17, 19, 21 y 23.
- 10 2.- Un ADN que codifica una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma, en la que una variante de inmunoglobulina que comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en M160N, A195N, T243N, E265N, Y299T, F331T y Q346N está glicosilada adicionalmente mediante modificación de un residuo aminoácido, caracterizada por que:  
 15 la variante de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs 17, 19, 21 y 23.
- 3.- Una proteína de fusión glicosilada, formada como resultado del enlace de (a) una inmunoglobulina glicosilada o una porción Fc de la misma, en la que una variante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada formando una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr, X es cualquier residuo aminoácido, excluida prolina, está adicionalmente glicosilada por modificación de un residuo aminoácido, con (b) al menos una proteína biológicamente activa o una porción de la misma, en donde la variante de inmunoglobulina, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en M160N, A195N, T243N, E265N, Y299T, F331T y Q346N, está glicosilada adicionalmente mediante modificación de un residuo aminoácido, caracterizada por que:  
 20 la variante de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs 17, 19, 21 y 23.
- 25 4.- La proteína de fusión glicosilada de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada por que la porción de la proteína biológicamente activa es un dominio extracelular soluble.
- 30 5.- La proteína de fusión glicosilada de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en donde la proteína biológicamente activa se selecciona del grupo que consiste en hemoglobina, proteínas del suero, citoquinas, interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factores estimulantes de colonias, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteínas activantes de fosfolipasa, insulina, proteínas vegetales, factor de necrosis tumoral (TNF) y sus alelos mutantes, factores de crecimiento, hormonas, calcitonina, péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), encefalina sintética, somatomedina, eritropoyetina, factores de liberación del hipotálamo, prolactina, gonadotropina crónica, agentes activantes de plasminógeno tisular, péptido liberador de hormona del crecimiento (GHRP), factor humoral tímico (THF), interleuquinas, interferones y enzimas.
- 35 6.- Una proteína de fusión glicosilada en forma dimérica, en que dos moléculas de la proteína de fusión glicosilada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 están enlazadas por un enlace disulfuro en una región de bisagra.
- 40 7.- Un ADN que codifica la proteína de fusión glicosilada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
- 45 8.- Un vector de expresión recombinante que comprende el ADN que codifica la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 7.
- 50 9.- El vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 8, que tiene el número de acceso KCCM-10572, depositado en el Centro de Cultivo de Microorganismos de Corea bajo las provisiones del Tratado de Budapest.
- 55 10.- Una célula hospedadora transformada o transfectada con el vector de expresión recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 8 ó 9.
- 60 11.- Un método para preparar una proteína de fusión glicosilada, que comprende: cultivar la célula hospedadora transformada o transfectada de acuerdo con la reivindicación 10 y aislar la proteína de fusión glicosilada a partir del cultivo resultante.

12.- Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión glicosilada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.

FIG. 1

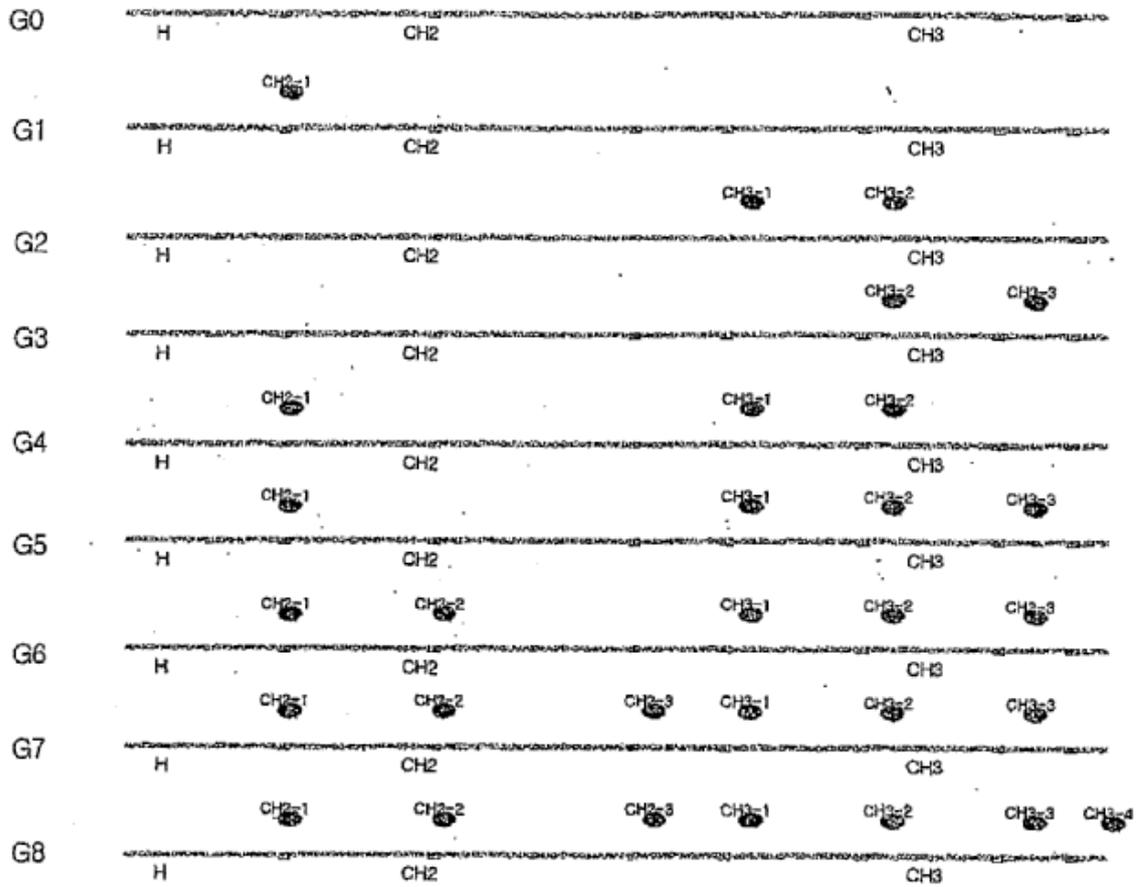


FIG. 2

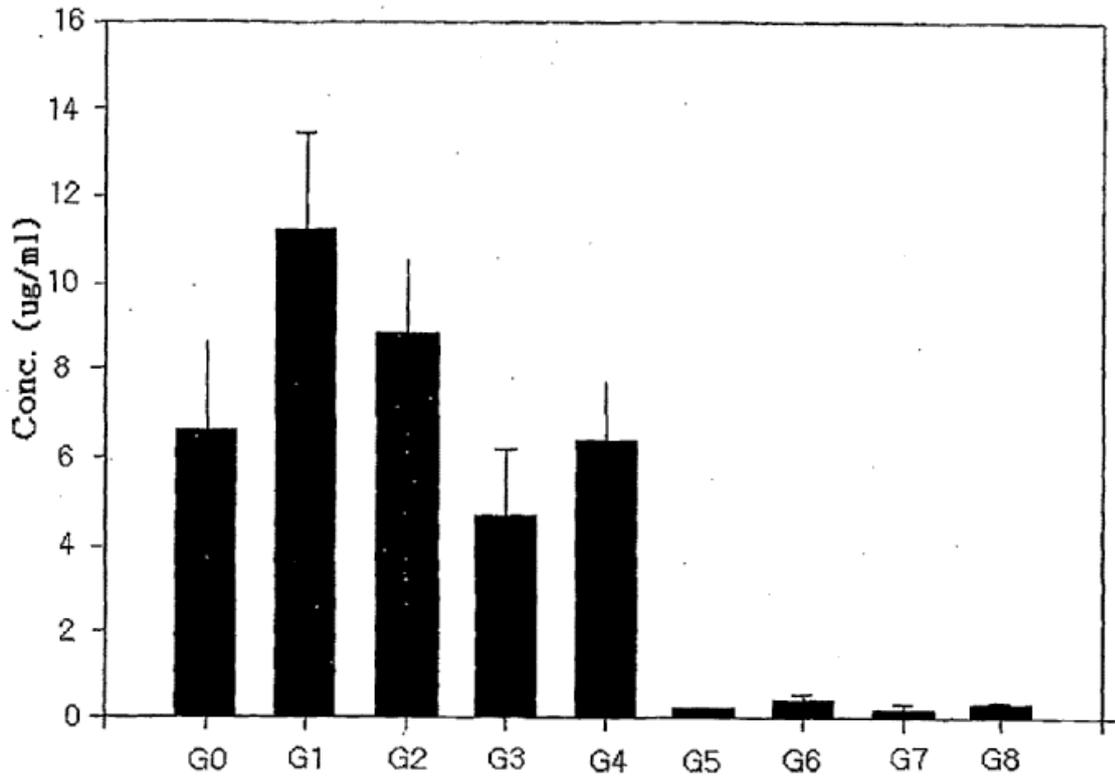


FIG. 3

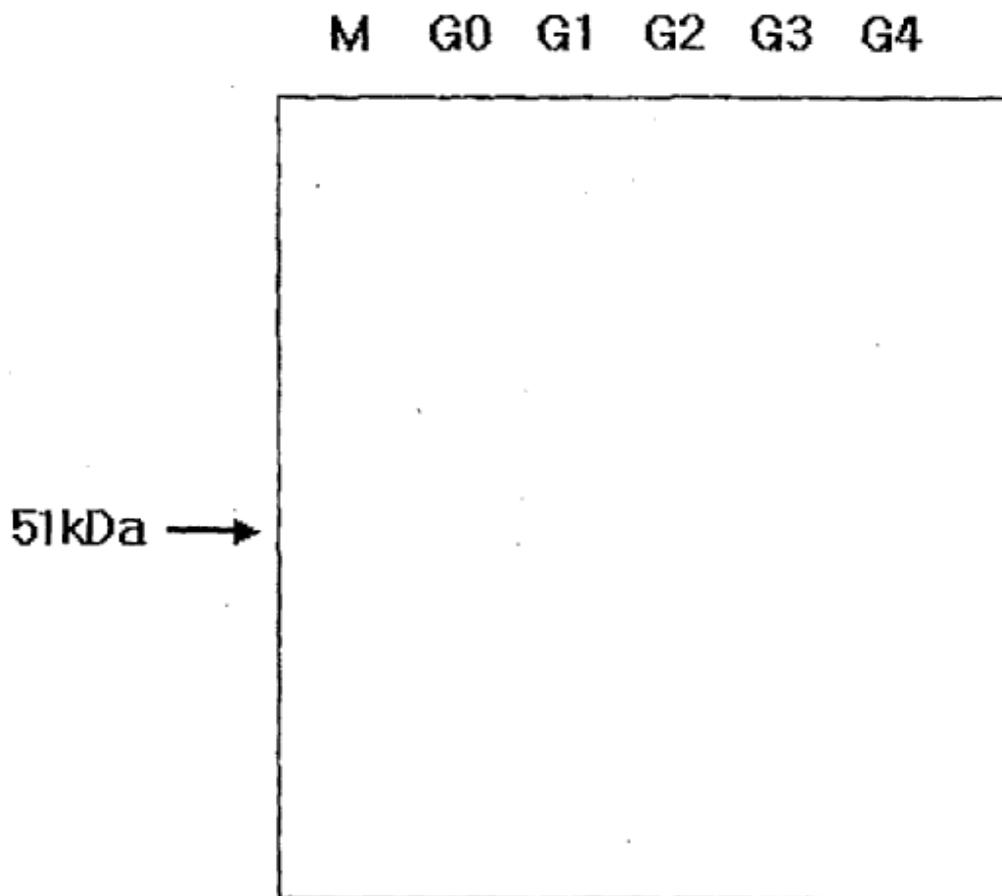


FIG. 4

