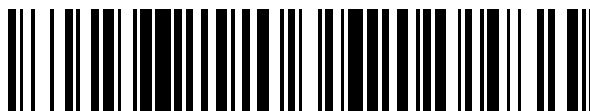


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 672**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2006** **E 06783620 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014** **EP 1928910**

54 Título: **Un procedimiento para la producción en masa de una región Fc de inmunoglobulina con residuos de metionina iniciales eliminados**

30 Prioridad:

16.08.2005 KR 20050074989

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2014

73 Titular/es:

HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550 Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon,
Hwaseong-si
Gyeonggi-do 445-813, KR

72 Inventor/es:

JUNG, SUNG YOUB;
KIM, JIN SUN;
SHIN, JIN HWAN;
KWON, SE-CHANG;
LEE, GWAN-SUN y
SONG, DAE HAE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 456 672 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

Un procedimiento para la producción en masa de una región Fc de inmunoglobulina con residuos de metionina iniciales eliminados

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una región Fc de inmunoglobulina monomérica o dimérica libre de residuos de metionina iniciales en una escala de masa.

Técnica anterior

- 10 Con las ventajas en ingeniería genética, se han desarrollado y utilizado un gran número de fármacos de proteínas. Susceptibles a desnaturalización o degradación proteolítica en el cuerpo, los fármacos de proteínas, sin embargo, son difíciles de mantener en concentraciones y títulos *in vivo* durante un periodo de tiempo largo. Es importante una mejora en la estabilidad de las proteínas *in vivo*, que puede dar lugar al mantenimiento de las concentraciones *in vivo* de los fármacos de proteínas en niveles adecuados no sólo para promover la eficacia del tratamiento, sino también para ayudar a los pacientes que necesitan inyecciones frecuentes de sus fármacos de proteínas, en términos de conveniencia y costes.

- 15 Se han realizado muchos esfuerzos para potenciar la estabilidad *in vivo* de los fármacos de proteínas durante largo tiempo, ejemplificada cambiando la formulación de proteínas, fusionando una proteína a otra proteína, o uniendo química o biológicamente un polímero adecuado a la superficie de una proteína.

Una técnica de este tipo es preparar una proteína de fusión con el fragmento Fc de inmunoglobulina.

- 20 El fragmento Fc media en las funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), así como la capacidad de unión a antígeno, que es la única función de las inmunoglobulinas. Además, el fragmento Fc contiene una secuencia que participa en la unión al receptor Fc neonatal (FcRn), que desempeña un papel en la regulación de los niveles de IgG en suero incrementando el transporte de IgG materna a los neonatos y la semivida de la IgG (Ghetie y Ward, *Immunology Today* 18: 592-598, 1997), y la secuencia regula la interacción entre proteína A y proteína G. Por medio de la fusión de este fragmento Fc con una proteína terapéutica, se han realizado muchos estudios para potenciar la estabilidad de la proteína terapéutica.

- 25 Por ejemplo, la patente coreana n.º 249572 divulga una proteína de fusión preparada uniendo una región Fc de cadena pesada de IgG1 (Fc) en un extremo amino terminal de la misma a un extremo carboxilo terminal de una proteína, tal como un receptor de IL4, un receptor de IL7, un receptor de G-CSF o un receptor de EPO, y produciendo la proteína de fusión resultante en células de mamífero. La patente de los EE. UU. N.º 5.605.690 describe una proteína de fusión que comprende un receptor del factor de necrosis tumoral fusionado en su extremo carboxilo terminal a un derivado de Fc de IgG1 humana, produciéndose la proteína de fusión en células animales. Además, Tanox Inc. informó, en las patentes de los EE. UU. N.º 5.723.125 y 5.908.626, de una molécula híbrida que comprende interferón alfa o beta humano que está unido en su extremo carboxilo terminal a Fc de IgG4 humana natural por medio de un enlazador peptídico, y se produce en células animales. Lexigen Inc., como describe en la publicación de la solicitud internacional PCT N.º WO 00/69913 preparó un Fc de IgG1 natural unido en su extremo carboxilo terminal al extremo amino terminal de interferón humano por recombinación genética sin el uso de un enlazador y produjo la proteína de fusión en células animales. La publicación de patente de los EE. UU. N. 20030082679 divulga una proteína de fusión con una semivida en suero prolongada, que comprende G-CSF humano unido en su extremo carboxilo terminal al extremo amino terminal de Fc de IgG1 y se produce en células animales. La publicación de patente de los EE. UU. N. 20010053539, la patente de los EE. UU. N. 6,030,613, las publicaciones de solicitud internacional PCT N.º WO 99/02709 y WO 01/03737 y la patente europea N.º 0464533B1 divulga una proteína de fusión Fc con una semivida en suero más larga que una proteína natural, que comprende un Fc de IgG1 o derivado de Fc unido en su extremo amino terminal por medio de un enlazador peptídico al extremo carboxilo terminal de EPO humana, TPO, hormona de crecimiento humana o interferón beta humano, produciéndose la proteína de fusión Fc en células animales.

- 30 Estas proteínas de fusión Fc, como se describe anteriormente, incrementan la semivida en suero de proteínas diana, pero conlleva problemas relacionados con la mediación de las funciones efectoras por el fragmento Fc (patente de los EE. UU. N.º 5.349.053). A través de las funciones efectoras del fragmento Fc, fijan complementos o se unen a células que expresan FcγRs, dando lugar a la lisis de células específicas, e inducen la producción y secreción de varias citocinas que inducen la inflamación, dando lugar a una inflamación no deseada. Además, la fusión crea una nueva secuencia de aminoácidos en una región de conexión entre el fragmento Fc y el compañero de proteína, lo que podría inducir potencialmente respuestas inmunitarias si se administra durante mucho tiempo.

- 35 A este respecto, se han realizado muchos esfuerzos para preparar una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina que tenga una semivida en suero larga pero que sea deficiente en funciones efectoras. Cole et al. informó de que, cuando los residuos aminoácidos de la región CH2 en las posiciones 234, 235 y 237, conocidos por desempeñar un papel importante en la unión a receptores Fc, se reemplazan con alanina para producir así un derivado Fc que tenga una afinidad de unión reducida a receptores Fc, se inhibe la actividad de ADCC (Cole et al., *J. Immunol.*

159: 3613-3621, 1997). Sin embargo, en todas estas variantes, el Fc puede tener una inmunogenicidad o antigenicidad incrementada en comparación con el fragmento Fc humano natural debido a la presencia de aminoácido no adecuados, y puede perder funciones de Fc deseables.

De entre los procedimientos de delección o reducción de funciones efectoras no deseables mientras se mantienen concentraciones en suero altas de una inmunoglobulina, uno de ellos se basa en retirar restos de azúcar de la inmunoglobulina. Como se describe en la patente de los EE. UU. N.º 5.585.097, se puede preparar un derivado de anticuerpo aglucosilado como anticuerpo anti-CD3 reemplazando un residuo glucosilado de anticuerpos, el residuo asparagina en la posición 297 del dominio CH2, con otro aminoácido. Este derivado de anticuerpo aglucosilado presenta funciones efectoras reducidas, pero aún retiene su afinidad de unión al receptor FcRn, sin cambios en su semivida en suero. Sin embargo, este derivado también es problemático en cuanto a que se reconoce potencialmente como un material exógeno y es rechazado por el sistema inmunitario debido a la producción de una construcción recombinante novedosa que tiene una secuencia anormal. La publicación de patente de los EE. UU. N.º 20030073164 divulga un procedimiento de producción de un derivado de Fc usando *E. coli* carente de capacidad de glucosilación para preparar un anticuerpo terapéutico deficiente en funciones efectoras.

La compañía americana Amgen Inc. describió, en la patente de los EE. UU. N.º 6.660.843 y en las publicaciones de patente de los EE. UU. N.º 20040044188 y 20040053845, un derivado de Fc de IgG1 humana que tiene delecciones de aminoácidos en los cinco primeros residuos aminoacídicos de la región bisagra, que está fusionada al extremo amino o carboxilo terminal de una proteína terapéutica o una proteína terapéutica imitada por un péptido, y la producción del mismo usando un huésped de *E. coli*. Sin embargo, esta proteína de fusión que no tiene una secuencia señal se expresa como los cuerpos de inclusión, y por tanto debe someterse a un procedimiento de replegado adicional. Este procedimiento de replegado de proteína reduce los rendimientos, y, en especial en una proteína presente como un homodímero o un heterodímero, reduce de forma marcada la producción de dímeros. Además, cuando una proteína no tiene una secuencia señal se expresa en *E. coli*, se añade un residuo de metionina al extremo N terminal del producto de expresión debido a la característica del sistema de expresión de proteína de *E. coli*. Los productos de expresión mencionados anteriormente de Amgen Inc. tienen un residuo de metionina N terminal, que puede inducir respuestas inmunitarias tras la administración repetida o excesiva al cuerpo. Además, puesto que estas moléculas de fusión se expresan en forma de proteína de fusión en *E. coli* uniendo un gen que codifica una proteína terapéutica a un gen de Fc, son difíciles de expresar en *E. coli*, o una proteína terapéutica es difícil de producir en *E. coli* si su expresión en *E. coli* en forma fusionada da como resultado una disminución significativa o una pérdida de la actividad. Además, puesto que la fusión de dos moléculas crea una secuencia de aminoácidos anormal no natural en la región de conexión entre dos proteínas, la proteína de fusión podría reconocerse potencialmente como "no propia" por el sistema inmunitario, e inducir, por tanto, respuestas inmunitarias.

Para resolver estos problemas, los presentes inventores prepararon previamente un fragmento Fc y un fármaco de proteína como polipéptidos por separado, sin usar un procedimiento de fusión basado en recombinación genética pero usando los mejores sistemas de expresión, y uniendo covalentemente los dos polipéptidos juntos para usar el fragmento Fc como un vehículo de fármaco. En este caso, es posible preparar un conjugado de un fármaco de polipéptido glucosilado y un Fc aglucosilado, que no induce respuestas inmunitarias no deseadas pero que tiene respuestas inmunitarias satisfactorias de actividad de fármaco fisiológica, duración y estabilidad *in vivo*.

En el caso anterior, puesto que es preferente que el Fc este en forma aglucosilada, se usa un sistema de expresión procariota tal como *E. coli*. Los procedimientos de producción de proteínas que usan un sistema de expresión de *E. coli* tienen varias ventajas sobre los procedimientos convencionales que usan células animales, como sigue. Un vector de expresión de *E. coli* se puede construir fácilmente, permitiendo así una evaluación rápida de la expresión de proteínas. Debido a su rápida tasa de crecimiento, *E. coli* permite la producción en masa de una proteína de interés a bajo coste. Además, se puede usar un procedimiento de expresión relativamente simple. Por tanto, *E. coli* es más útil para una producción comercial que otras células huésped.

La mayoría de las regiones Fc están presentes como cuerpos de inclusión tras las sobreexpresión en *E. coli*. Por este motivo, la industria demanda que las regiones Fc se expresen en forma soluble en agua en *E. coli*. La patente europea N.º 0227110 divulga la producción de la región Fc de inmunoglobulina G1 usando sólo el producto (el lisado celular) que se expresa en forma soluble en agua tras la sobreexpresión de la región Fc de inmunoglobulina G1. Sin embargo, sólo la inmunoglobulina expresada en forma soluble en agua tiene un rendimiento de tan solo 15 mg/l, lo que no tiene valor en cuando a utilidad industrial. La solicitud de patente coreana n.º. 0092783, resuelve el problema encontrado en la técnica anterior, introduce una técnica novedosa de expresión de una región Fc de inmunoglobulina no como cuerpos de inclusión sino en una forma soluble en agua en *E. coli* por medio de la fusión de la secuencia de nucleótidos correspondiente a la región Fc a una secuencia señal de *E. coli*. Tras la expresión en *E. coli*, la proteína de interés está presente en forma soluble desprovista de péptido señal con un incremento en el rendimiento de producción de la misma en hasta 600 mg/l.

Dando lugar a la presente invención, la investigación intensiva y minuciosa de un procedimiento de producción de regiones Fc de inmunoglobulina aglucosilada activas libres de respuesta inmunitaria, llevada a cabo por los presentes inventores, con el objetivo de incrementar el rendimiento de producción hasta un nivel adecuado para la industrialización, dio como resultado el hallazgo de que cuando una secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc de inmunoglobulina se expresa en una forma fusionada en el extremo N terminal a una región bisagra específica, la

región Fc de inmunoglobulina se expresa como cuerpos de inclusión que son finalmente un dímero o un monómero de la región Fc de inmunoglobulina desprovista de residuos de metionina iniciales por medio de procedimientos de solubilización y replegado.

- 5 El documento WO 01/18203 divulga composiciones de proteína de fusión osteoprotegerina, procedimientos de preparación de dichas composiciones y usos de las mismas. El documento WO 2005/047334 divulga un fragmento Fc de IgG, un vector recombinante que expresa el fragmento Fc de IgG, un transformante transformado con el vector recombinante y un procedimiento de preparación de un fragmento Fc de IgG que comprende cultivar el transformante.

Divulgación de la invención

- 10 La presente invención proporciona un procedimiento de producción de una región Fc de inmunoglobulina libre de un residuo de metionina codificada por un codón de iniciación en una escala en masa, que comprende:

preparar un vector de expresión recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc de inmunoglobulina recombinante compuesta de una región Fc de inmunoglobulina unida a un extremo N terminal de la misma a una región bisagra de la inmunoglobulina por medio de un enlace peptídico; transformar un E. coli con el vector de expresión recombinante para crear un transformante;

- 15 cultivar el transformante para expresar la región Fc de inmunoglobulina como un cuerpo de inclusión;
aislar y purificar la región Fc de inmunoglobulina del cuerpo de inclusión; y
solubilizar y replegar el fragmento Fc de inmunoglobulina,
en el que dicha región bisagra de inmunoglobulina tiene cisteína, serina o prolina como aminoácido inicial del extremo N terminal.

Breve descripción de los dibujos

El anterior y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se comprenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

- 25 La FIG. 1 es una fotografía de gel de electroforesis que muestra la formación de fragmentos de región Fc monoméricos y dimericos de cuerpos de inclusión expresados usando un vector de expresión que tiene un nucleótido que codifica una región Fc de inmunoglobulina IgG4 humana;

La FIG. 2 muestra los resultados de ELISA para la capacidad de unión a C1q de la región Fc de inmunoglobulina IgG4 humana;

La FIG. 3 muestra los resultados de ELISA para la capacidad de unión a FcγRI de la región Fc de inmunoglobulina IgG humana;

- 30 La FIG. 4 muestra los resultados de ELISA para la capacidad de unión a FcγRIII de la región Fc de inmunoglobulina IgG humana;

La FIG. 5 muestra los resultados de ELISA para la capacidad de unión a FcRnαβ₂ de la región Fc de inmunoglobulina IgG humana;

- 35 La FIG. 6 muestra los resultados de las semividas en suero de un conjugado EPO-PEG-Fc preparado usando una región Fc de inmunoglobulina IgG humana como vehículo;

La FIG. 7 es una fotografía de un gel de SDS-PAGE al 15 % en el que, después de mezclarse con volúmenes iguales de un tampón de muestra de proteína 2x, se hacen correr partes de las soluciones fermentadas obtenidas haciendo crecer transformantes microbianos del ejemplo 2 en fermentadores bajo una condición de expresión;

- 40 La FIG. 8 es una fotografía de un gel de SDS-PAGE en el que las proteínas replegadas de los cuerpos de inclusión expresadas por los transformantes del ejemplo 2 se separan y se visualizan como bandas;

La FIG. 9 es una fotografía de un gel de SDS-PAGE al 15 % en el que, después de mezclarse con volúmenes iguales de un tampón de muestra de proteína 2x, se hacen correr partes de las soluciones fermentadas obtenidas haciendo crecer transformantes microbianos del ejemplo 3 en fermentadores bajo una condición de expresión; y

- 45 La FIG. 10 es una fotografía de un gel de SDS-PAGE al 15 % en el que, después de mezclarse con un tampón de muestra de proteína libre de agente reductor tal como DTT o beta-mercaptoetanol, se hacen correr los respectivos productos expresados y purificados en el ejemplo 3.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una región Fc de

inmunoglobulina libre de un residuo de metionina codificada por un codón de iniciación en una escala en masa, que comprende:

5 preparar un vector de expresión recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc de inmunoglobulina recombinante compuesta de una región Fc de inmunoglobulina unida a un extremo N terminal de la misma a una región bisagra de la inmunoglobulina por medio de un enlace peptídico;

transformar un *E. coli* con el vector de expresión recombinante para crear un transformante;

cultivar el transformante para expresar la región Fc de inmunoglobulina como un cuerpo de inclusión;

aislar y purificar la región Fc de inmunoglobulina del cuerpo de inclusión; y

solubilizar y replegar el fragmento Fc de inmunoglobulina,

10 en el que dicha región bisagra de inmunoglobulina tiene cisteína, serina o prolina como aminoácido inicial del extremo N terminal.

15 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción en masa de una región Fc de inmunoglobulina útil como vehículo para fármacos de proteínas. Cuando se fusiona una región Fc de inmunoglobulina en el extremo N terminal a una región bisagra, se descubre que la región Fc de inmunoglobulina recombinante resultante se expresa como un cuerpo de inclusión y después se solubiliza y se repliega en un dímero o monómero en una forma activa desprovista del residuo de metionina inicial por codificado por el codón de iniciación. La presente invención es de gran relevancia en cuanto al hallazgo de que, cuando se fusiona a una región Fc de inmunoglobulina, una región bisagra desempeña un papel fundamental en el procesado y replegado de la región Fc recombinante en una forma de secuencia natural desprovista del residuo de metionina inicial codificado por el codón de iniciación.

20 La región bisagra que puede permitir que una región Fc de inmunoglobulina se produzca en masa en una forma recombinante con la misma puede ser un derivado de IgG, IgA, IgM, IgE o IgD de seres humanos y otros animales, incluyendo cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, con preferencia por un derivado de IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 (SEQ. ID. NO.: 14 a 17). La región bisagra útil en la presente invención puede ser una región bisagra de longitud completa o un fragmento del mismo. Es preferente un fragmento de región bisagra que 25 tenga dos o más secuencias de aminoácidos consecutivas, que son más preferentes cuando contienen al menos un residuo de cisteína en la misma. Son de uso práctico en la presente invención fragmentos de la región bisagra derivados de IgG4 de SEQ. ID. NO. 17, que se representan por SEQ. ID. NO.: 18, 19, 20 y 21. Cuando se emplean regiones bisagra de SEQ. ID. NO.: 18, 19 y 20, la región Fc de inmunoglobulina se puede preparar en una forma de dímero o monómero. La región bisagra de SEQ. ID. NO. 21 permite eficazmente la preparación de un monómero de la 30 región Fc de inmunoglobulina. En otras implementaciones de la presente invención, se usaron fragmentos, representados por SEQ. ID. NO.: 49 y 51 a 55, de la región bisagra derivada de IgG1 de SEQ. ID. NO. 14 y, representada por SEQ. ID. NO.: 56 a 60, de la región bisagra derivada de IgG2 de SEQ. ID. NO. 15 para producir un dímero de la región Fc de inmunoglobulina.

35 La región Fc de inmunoglobulina que se puede producir por la presente invención puede ser una forma natural aislada de seres humanos y otros animales incluyendo cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o puede ser un recombinante o un derivado de la misma, obtenida de microorganismos o células animales transformadas. Pueden ser preferentes una región Fc de IgG, IgA, IgM, IgE e IgD de seres humanos, o una combinación o híbrido de las mismas. El término "combinación", como se usa en el presente documento, quiere decir que los polipéptidos que 40 codifican fragmentos Fc de inmunoglobulina monocatenaria del mismo origen se unen a un polipéptido monocatenario de origen diferente para formar un dímero o multímero. El término "híbrido", como se usa en el presente documento, quiere decir que, en un fragmento Fc de inmunoglobulina monocatenaria están presentes secuencias que codifican dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulina de origen diferente. Preferentemente, la inmunoglobulina puede ser una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o una combinación o híbrido de las mismas. Las secuencias de nucleótidos que codifican regiones Fc de inmunoglobulina humana y las secuencias de aminoácidos limitadas a las mismas, útiles en la 45 presente invención, pueden ser las codificadas por secuencias de nucleótidos de las bases de datos GenBank y/o EMBL.

50 La región Fc de inmunoglobulina producida por la presente invención incluye un derivado de secuencia de aminoácidos. El término "derivado de secuencia de aminoácidos" quiere decir una secuencia en la que uno o más residuos aminoácidos difieren de una secuencia de aminoácidos de origen natural, y se puede producir de forma natural o generarse de forma artificial. La región Fc de inmunoglobulina incluye derivados que resultan de una delección, una inserción, una sustitución conservadora o no conservadora o combinaciones de las mismas. Típicamente, una inserción se realiza por la adición de una secuencia de aminoácidos consecutiva de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, o se puede realizar con una secuencia más larga. Típicamente, una delección 55 está en el intervalo de aproximadamente 1 a 30 residuos aminoácidos. Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que, en general, no alteran la actividad de las proteínas o péptidos, son conocidos en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, The proteínas, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios que se producen más comúnmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, en ambas direcciones. Dichos derivados se pueden preparar por

medio de un procedimiento de síntesis peptídica química o un procedimiento de recombinación basada en secuencia de ADN, que son conocidos en la técnica (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2ª Ed., 1989).

Además, si se desea, se puede modificar la región Fc de inmunoglobulina por fosforilación, sulfatación, acrilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación y amidación.

El derivado de inmunoglobulina producido por la presente invención es preferentemente un equivalente funcional a su forma natural, presentando, por tanto una actividad biológica similar, o, si se desea, se podría realizar alterando la propiedad de la forma natural. Preferentemente, los derivados de la región Fc de inmunoglobulina son proteínas que tienen una estabilidad estructural incrementada frente al calor, pH, etc., o solubilidad, o que tienen características mejoradas en cuanto a la formación de enlace disulfuro, compatibilidad con un huésped de expresión, unión a complemento, unión a receptor de Fc y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), siempre que los derivados producidos no sean tan diferentes de las formas naturales de los seres humanos que induzcan respuestas inmunitarias no deseadas en seres humanos y animales. Son derivados preferentes las regiones Fc de IgG1 que están alteradas en un residuo específico de este tipo para presentar una afinidad reducida a receptores de Fc que median la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Un derivado producido puede contener una delección o una sustitución con otro aminoácido en el residuo leucina en la posición 234 de una secuencia CH2 de IgG1 (véase la secuencia de la base de datos de Kabat para la numeración de los residuos aminoácidos). Lo más preferentemente, se reemplaza Leu234 por fenilalanina, un residuo aminoácido en una posición correspondiente en IgG4.

De acuerdo con la presente invención, se prepara una secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc de inmunoglobulina recombinante en la que se fusiona una región Fc de inmunoglobulina a una región bisagra de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "región Fc de inmunoglobulina recombinante" quiere decir una región Fc de inmunoglobulina unida en el extremo N terminal a una región bisagra por medio de un enlace peptídico.

Dependiendo de la región Fc de inmunoglobulina, se puede escoger la región bisagra que se va a fusionar. Es preferente una región bisagra que sea la misma en origen que la región Fc de inmunoglobulina. En la práctica real de la presente invención, se preparó una secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc de inmunoglobulina recombinante que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ. ID. NO.: 7, 9, 11 o 13, en la que una región Fc derivada de IgG4 se fusiona a una región bisagra que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ. ID. NO.: 18, 19, 20 o 21. Las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones Fc de inmunoglobulina recombinantes se representan por SEQ. ID. NO.: 6, 8, 10 y 12, respectivamente.

En otra implementación, se preparó una secuencia de nucleótidos que codifican una región Fc de inmunoglobulina recombinante que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta como en SEQ. ID. NO. 25, 29, 31, 33, 35 o 37, en la que una región Fc derivada de IgG1 se fusiona a una región bisagra que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta como una de SEQ. ID. NO.: 49 y 51 a 55. Las secuencias de nucleótidos resultantes que codifican las regiones Fc de inmunoglobulina recombinantes se representan por SEQ. ID. NO.: 24, 28, 30, 32, 34 y 36.

En otra implementación, se preparó una secuencia de nucleótidos que codifican una región Fc de inmunoglobulina recombinante que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta como en SEQ. ID. NO. 39, 41, 43, 45 o 47, en la que una región Fc derivada de IgG2 se fusiona a una región bisagra que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta como una de SEQ. ID. NO.: 56 a 60. Las secuencias de nucleótidos resultantes que codifican las regiones Fc de inmunoglobulina recombinantes se representan por SEQ. ID. NO.: 38, 40, 42, 44 y 46.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan vectores de expresión recombinantes a los que están unidos de forma funcional las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones Fc de inmunoglobulina recombinantes.

El término "vector de expresión recombinante", como se usa en el presente documento, que describe un vector que puede expresar una proteína diana en una célula huésped adecuada, se refiere a una construcción genética que comprende elementos reguladores esenciales a los que se une de forma funcional un inserto de gen de tal forma que se exprese en una célula huésped.

El término "unido de forma funcional", como se usa en el presente documento, se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácidos nucleicos y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína diana de tal forma que permita funciones generales. El enlace funcional a un vector recombinante se puede preparar usando técnica recombinante genética bien conocida en la técnica, y la escisión y ligación de ADN específica de sitio se puede llevar a cabo usando enzimas conocidas generalmente en la técnica. Un vector de expresión adecuado incluye elementos reguladores de la expresión, tales como un promotor, un codón de iniciación, un codón de detención, una señal de poliadenilación y un potenciador. Los codones de iniciación y detención son necesarios para la funcionalidad en un individuo al que se le ha administrado una construcción genética, y deben estar en fase con la secuencia codificante. El promotor del vector puede ser constitutivo o inducible. Además, los vectores de expresión incluyen un marcador seleccionable que permite la selección de células huésped que contienen el vector, y los vectores de expresión replicables incluyen un origen de replicación. En la práctica detallada de la presente

invención, se preparan los siguientes vectores de expresión recombinantes: pmSCPFc, pmPSCFc, pmCPSFc, pmCPFc, pmSCKFc, pmCPAFc, pmPKSFc, pmCPPFc, pmPPCFc, pmPCPFc, pmPPCG2Fc, pmPCPG2Fc, pmCPG2Fc, pmCCVG2Fc y pmCVE2Fc.

Los vectores de expresión recombinantes que expresan las proteínas se transforman en las células huésped.

- 5 La presente invención utiliza células huésped que son células procariotas en las que no se produce glucosilación, estas son específicamente *E. coli*. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de cepas de *E. coli* incluyen BL21 (DE3), JM109, serie DH, TOP10 y HB101. Es más preferente la cepa BL21 (DE3). Debido a que falta un sistema para la glucosilación de proteínas, se puede usar *E. coli* como célula huésped en la que se produce una región Fc de inmunoglobulina en la forma de estar desprovista de restos de azúcar que están presentes en un dominio CH2 de una inmunoglobulina natural. Los restos de azúcar del dominio CH2 de inmunoglobulina no afectan a la estabilidad estructural de las
- 10 inmunoglobulinas, pero provocan que las inmunoglobulinas medien en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en asociación con células que expresan receptores de Fc y células inmunitarias, para secretar citocinas para inducir inflamación. Además, los restos de azúcar se unen a la parte de C1q del primer componente C1 del complemento, lo que da lugar a la fijación del complemento. Por tanto, cuando se produce una
- 15 región Fc de inmunoglobulina en una forma aglucosilada y se une a una proteína terapéutica, la proteína terapéutica está presente en el suero durante un periodo de tiempo prolongado sin las funciones efectoras no deseadas de las inmunoglobulinas.

- La transformación de los vectores de expresión recombinantes en células procariotas se puede lograr por cualquier procedimiento que permita que los ácidos nucleicos se introduzcan en las células y, como es conocido en la técnica, se
- 20 puede realizar seleccionando técnicas estándar adecuadas de acuerdo con las células huésped. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, electroporación, fusión de protoplastos, precipitación de fosfato de calcio (CaPO₄), precipitación de cloruro de calcio (CaCl₂), agitación con fibra de carburo de silicio, y transformación mediada por PEG, dextranosulfato y lipofectamina.

- En la práctica detallada de la presente invención, los vectores de expresión recombinantes se introducen individualmente
- 25

- en *E. coli*, generando así los siguientes transformantes: BL21/pmSCPFc(HM11200), BL21/pmPSCFc(HM11201), BL21/pmCPSFc(HM11204), BL21/pmCPAFc(HM11205), BL21/pmSCDFc(HM11207), BL21/pmCPAFc(HM11209), BL21/pmPKSFc(HM11210), BL21/pmCPPFc(HM11211), BL21/pmPPCFc(HM11212), BL21/pmPCPFc(HM11213), BL21/pmPPCG2Fc(HM11214), BL21/pmPCPG2Fc(HM11215), BL21/pmCPG2Fc(HM11216) y
- 30 BL21/pmCCVG2Fc(HM11217), BL21/pmCVEG2Fc (HM11218).

Los transformantes que se anclan a los vectores de expresión recombinantes de los mismos se cultivan por medio de un procedimiento general.

- Las condiciones de cultivo se pueden ajustar fácilmente de acuerdo con la cepa bacteriana por los expertos en la técnica. Típicamente, el medio usado para el cultivo debe contener todos los nutrientes esenciales para el crecimiento y supervivencia de las células. El medio debe contener una variedad de fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y
- 35 elementos traza. Los ejemplos de fuentes de carbono disponibles incluyen glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, carbohidratos tales como celulosa, grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco, ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estas fuentes de carbono se pueden usar por separado o en combinaciones de dos o más. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno disponibles incluyen fuentes de nitrógeno orgánicas, tales como peptona, extracto de levaduras, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz
- 40 clorado (CSL) y suero de leche de soja, y fuentes de nitrógeno inorgánicas, tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar por separado o en combinaciones de dos o más. En el medio puede estar contenida una fuente de fósforo, que incluye dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio y las sales que contienen sodio correspondientes. Además, el medio puede contener una sal metálica, tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. El medio puede incluir además aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados. El pH del cultivo se puede ajustar añadiendo un compuesto, tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico, al cultivo usando un procedimiento adecuado. Además, durante el cultivo, se pueden usar agentes antiespumantes, tales como
- 50 ésteres de ácidos grasos poliglicólicos, para evitar la formación de burbujas. Para mantener el cultivo en un estado deseable, en el cultivo se introduce oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire). En general, la temperatura del cultivo es de 20 °C a 45 °C, y preferentemente de 25 °C a 45 °C. Además, se puede usar un fermentador para la producción de proteínas en una gran escala. La producción de proteínas usando un fermentador se debe llevar a cabo teniendo en cuenta varios factores, incluyendo la tasa de crecimiento de las células huésped y los niveles de expresión de proteínas. Se puede inducir la expresión de proteínas por medio de la adición, por ejemplo,
- 55 de IPTG al medio en condiciones de cultivo adecuadas.

Se puede purificar una región Fc de inmunoglobulina sobreexpresada como cuerpos de inclusión por medio de una técnica general. Las regiones Fc de inmunoglobulina producidas en los transformantes se pueden obtener rompiendo las células usando un sistema French Press, un ultrasonificador, etc., recogiendo sólo cuerpos de inclusión insolubles

en agua que contienen la región Fc de inmunoglobulina por medio de centrifugación, solubilizando y desnaturalizando la fracción recogida con agentes de replegado, tales como urea, guanidina, arginina, cisteína, beta-mercaptoetanol, etc. para el replegado de la misma, y purificando la proteína de fusión replegada por medio de diálisis, varias cromatografías, tales como cromatografía de filtración en gel, de intercambio iónico y en columna de fase inversa, y ultrafiltración, sola o en combinación. En general, este procedimiento de replegado es muy complicado y se sabe que produce un rendimiento de replegado muy bajo y asegura la proteína replegada sólo de menor actividad que la proteína soluble en agua.

Sin embargo, el procedimiento de la presente invención puede superar los problemas mencionados anteriormente y producir una región Fc de inmunoglobulina activa desprovista del residuo de metionina inicial en una escala en masa. En conjunto, cuando se expresa y se produce en *E. coli*, una proteína exógena tiene un residuo de metionina inicial codificado por el codón de iniciación. La administración repetitiva o excesiva del producto de proteína que tiene la metionina inicial para cuerpos humanos puede provocar una respuesta inmunitaria suficiente para reducir el efecto terapéutico del mismo para que sea tóxico. Sin embargo, cuando la región Fc de inmunoglobulina recombinante producida por la presente invención se expresa en *E. coli*, se descubre que el residuo de metionina inicial se escinde por una aminopeptidasa, una enzima citoplásmica intrínseca, medido por análisis de secuenciación N terminal (Adams et al., J. Mol. Biol. 33:571-589, 1968, Takeda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60:1487-1494, 1968). Se sabe que la actividad de dichas aminopeptidasas depende de la secuencia y la estructura de la proteína de interés (Moerschell et al., J. Biol. Chem. 265:19638-19643, 1990, James et al., Protein Expression and Purification 41:45-52, 2005). Una región bisagra, cuando se fusiona a una región Fc de inmunoglobulina, se ve afectada por una aminopeptidasa de modo que la metionina inicial se procesa hasta un punto que depende de la secuencia de aminoácidos de la misma.

Debido a que las propiedades de la región bisagra determinan la modificación post-traducciona de las proteasas, la proporción de dímeros con respecto a monómeros se puede controlar eficazmente seleccionando regiones bisagra apropiadas. Además, cuando se repliegan los cuerpos de inclusión, la formación de dímeros precisos está impedida por el emparejamiento erróneo de las cisteínas en los enlaces disulfuro. Sin embargo, el procedimiento de acuerdo con la presente invención garantiza la formación de enlaces disulfuro precisos, dando lugar, de este modo, a la formación de dímeros activos.

Además, la presente invención puede producir regiones Fc de inmunoglobulina a una escala mayor que los procedimientos convencionales. Por ejemplo, se produce una región Fc de inmunoglobulina en un rendimiento de 15 mg/l de acuerdo con el procedimiento de la patente europea n.º EP0227110, en la que la región Fc de G1 se sobreexpresa y se purifica sólo a partir de lisado celular que contiene la forma soluble en agua de la misma, y en un rendimiento de 50 a 600 mg/l de acuerdo con el procedimiento de la solicitud de patente coreana n.º 0092783, en la que una región Fc de inmunoglobulina fusionada a una secuencia señal de *E. coli* se expresa en una forma soluble en agua, pero no como un cuerpo de inclusión. Sin embargo, la presente invención puede producir una región Fc de inmunoglobulina en un rendimiento tan alto como de 3 a 6 g/l purificando un cuerpo de inclusión de recombinante región Fc de inmunoglobulina una región Fc de inmunoglobulina que contiene una región bisagra. Por tanto, el procedimiento de la presente invención garantiza un sistema altamente útil para producir regiones Fc de inmunoglobulina en una escala industrial en un rendimiento mucho mayor que los procedimientos convencionales.

La región Fc de inmunoglobulina producida en células procariotas tales como *E. coli* de acuerdo con el presente procedimiento no tiene aplicaciones industriales específicamente limitadas. Una aplicación ejemplar es el uso como vehículo para la formación de un conjugado con un fármaco determinado. La construcción del conjugado que comprende la región Fc de inmunoglobulina unida a un fármaco no está específicamente limitada. Por ejemplo, la región Fc de inmunoglobulina y el fármaco pueden estar unidos juntos en varias proporciones, y el enlace puede estar mediado, por ejemplo, por medio de un enlazador.

El fármaco incluye polipéptidos, compuestos, extractos y ácidos nucleicos. Es preferente un fármaco de polipéptido (usado para tener un significado idéntico a la palabra "proteína"). Los ejemplos del enlazador útil en la presente invención incluyen enlazadores peptídicos y no peptídicos, con preferencia por un enlazador no peptídico y mayor preferencia por un polímero no peptídico. Un ejemplo preferente de la cadena pesada de inmunoglobulina es Fc.

Si se necesita potenciar la semivida en suero, se puede usar cualquier polipéptido fisiológicamente activo sin limitación específica como compañero de proteína de la región Fc de inmunoglobulina preparado de acuerdo con el presente procedimiento para formar un conjugado. Dichos polipéptidos fisiológicamente activos incluyen los usados para tratar o prevenir enfermedades humanas, que incluyen citocinas, interleucinas, proteína de unión a interleucina, enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, factores reguladores de la transcripción, factores de coagulación, vacunas, proteínas estructurales, proteínas o receptores ligandos, antígenos de superficie celular, antagonistas de receptores, y derivados y análogos de los mismos.

En detalle, ejemplos no limitantes del polipéptido fisiológicamente activo incluyen hormona de crecimiento humana, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, péptido liberador de la hormona de crecimiento, interferones y receptores de interferones (por ejemplo, interferón- α , - β y - γ , receptor de interferón tipo I soluble en agua, etc.), factores estimuladores de colonias de granulocitos, interleucinas (por ejemplo, interleucina-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, etc.) y receptores de interleucinas (por ejemplo, receptor de IL-1, receptor de IL-4, etc.), enzimas (por ejemplo, glucocerebrosidasa,

iduronato-2-sulfatasa, alfa-galactosidasa-A, agalsidasa alfa y beta, alfa-L-iduronidasa, butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato descarboxilasa, imiglucerasa, lipasa, uricasa, factor activador plaquetario acetilhidrolasa, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a interleucina y citocina (por ejemplo, IL-18bp, proteína de unión a TNF, etc.), factor activador de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de linfocitos B, factor de linfocitos T, proteína A, inhibidor de alergia, glucoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfoxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento de metástasis, antitripsina alfa-1, albúmina, alfa-lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glucosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor XIII, factor activador de plasminógeno, péptido de unión a fibrina, urocinasa, estreptocinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de collagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado plaquetario, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angioestatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimuladora ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor activador de tejido conectivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona estimuladora de folículo, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de axogénesis 1, péptido natriurético cerebral, factor neurotrófico derivado glial, netrina, factor inhibidor neutrófilo, factor neurotrófico, neurturina, etc.), hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento tipo insulina, hormona adrenocorticoide, glucagón, colecistocinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimuladora tiroidea, autotaxina, lactoferrina, mioestatina, receptores (por ejemplo, TNFR(P75), TNFR(P55), receptor de IL-1, receptor de VEGF, receptor del factor de activación de linfocitos B, etc.), antagonistas de receptores (por ejemplo, ILI-Ra etc.), antígenos de superficie celular (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fd), y antígenos de vacuna derivados de virus. El polipéptido fisiológicamente activo útil en la presente invención puede ser una forma natural, se puede producir por recombinación genética usando células procariotas, tales como *E. coli*, o células eucariotas, tales como células de levaduras, células de insectos y células animales, o puede ser un derivado que tenga una o más mutaciones de aminoácidos pero que muestre actividad biológica idéntica a la de la forma natural.

En un modo de realización preferente de la presente invención, se unió un fragmento de la región Fc de inmunoglobulina producido usando el transformante HM11201 a eritropoyetina humana (EPO) usando polietilenglicol, proporcionando así un conjugado de proteínas EPO-PEG-región Fc de inmunoglobulina. Se descubrió que este conjugado de proteínas presentaba una semivida en suero prolongada en comparación no sólo con la EPO natural sino también con Aranesp (Amgen), conocido como un EPO de segunda generación con una semivida mejorada. Por tanto, se puede usar la región Fc de inmunoglobulina desprovista del residuo de metionina inicial, obtenida a partir de cuerpos de inclusión usando una región bisagra de acuerdo con la presente invención, para potenciar la semivida en suero y la actividad fisiológica del polipéptido fisiológicamente activo unido a la misma, sin riesgo de inducción de respuesta inmunitaria.

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención por medio de los siguientes ejemplos, que se exponen para ilustrar, pero no deben interpretarse como límite de la presente invención.

Ejemplo 1: Construcción del vector de expresión de la región Fc de inmunoglobulina IgG4 humana, expresión y purificación de la región Fc de IgG4, y análisis de secuencia N terminal

<1-1> Construcción del vector de expresión de la región Fc de IgG4

Para clonar una región Fc de cadena pesada que incluye la región bisagra de inmunoglobulina IgG4 humana, se llevó a cabo una RT-PCR sirviendo el ARN de células sanguíneas humanas como molde, como sigue. En primer lugar, se aisló ARN total de aproximadamente 6 ml de sangre usando un kit para sangre Qiamp RNA (Qiagen), y se realizó la amplificación génica usando el ARN total como molde con la ayuda de un kit de RT-PCR de una etapa (Qiagen). Para amplificar genes que tienen secuencia N terminales diferentes, se usaron pares de cebadores representados por SEQ ID NOS. 1 y 2, 3 y 2, 4 y 2, y 5 y 2. Para facilitar un procedimiento de clonación génica posterior, se introdujeron un sitio de reconocimiento de Nde I y el codón de iniciación ATG, necesarios para la expresión de la proteína, en cebadores en 5' de SEQ ID NOS. 1, 3, 4 y 5, y un sitio de reconocimiento de BamHI que contiene un codón de detención en cebadores en 3' de SEQ ID NO. 2. Se digirieron los productos de región Fc amplificados con Nde I y Hind III, y se insertaron en un a pET22b (Novagen) tratado con la misma enzima de restricción, dando así los respectivos plásmidos recombinantes. Estos plásmidos se diseñaron para tener partes de la secuencia de aminoácidos total Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro [SEQ ID NO: 17] de la región bisagra de IgG4, como sigue.

El plásmido que contenía un gen amplificado con SEQ ID NOS. 1 y 2 se denominó pmSCPFc y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos N terminal que comienza con Met-Ser-Cys-Pro (Met-[SEQ ID NO: 18]), que se determinó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 6, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7. El plásmido que contenía un gen amplificado con SEQ ID NOS. 3 y 2 se denominó pmPSCFc y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos N terminal que comienza con Met-Pro-Ser-Cys-Pro (Met-[SEQ ID NO: 19]), que se determinó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 8, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 9. Un plásmido que contenía un gen amplificado con SEQ ID NOS. 4 y 2 se denominó pmCPSFc y se ancló al mismo

una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos N terminal que comienza con Met-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (Met-[SEQ ID NO: 20]), que se determinó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 10, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 11. Un plásmido que contenía un gen amplificado con SEQ ID NOS. 5 y 2 se denominó pmCPFc y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica una

secuencia de aminoácidos N terminal que comienza con Met-Cys-Pro (Met-[SEQ ID NO: 21]), que se determinó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 12 correspondiente a SEQ ID NO. 13.

Los vectores de expresión se transformaron en BL21 (DE3) de *E. coli* para preparar transformantes designados respectivamente BL21/pmSCPFC(HM11200), BL21/pmPSCFc(HM11201), BL21/pmCPSFc(HM11204) y BL21/pmCPFc(HM11205). Los transformantes BL21/pmSCPFC(HM11200) y BL21/pmPSCFc(HM11201) se depositaron en Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 20 de junio de 2005 con los números de acceso KCCM-10659P y KCCM-10660P, respectivamente, y los transformantes BL21/pmCPSFc(HM11204) y BL21/pmCPFc(HM11205) en KCCM el 28 de julio de 2005 con los números de acceso KCCM-10665P y KCCM-10666P, respectivamente.

<I-2> Expresión y purificación de Fc de IgG4

Los transformantes bacterianos preparados en el ejemplo <I-2> se inocularon en fermentadores respectivos (Marubishi Company) y se dejó que crecieran, seguido de la determinación de si expresaban los fragmentos de región Fc de inmunoglobulina.

En primer lugar, se hizo crecer cada transformante en 100 ml de medio LB con agitación durante la noche y se inoculó en un fermentador para un cultivo a gran escala. Se mantuvo el fermentador a 28 °C o 35 °C. Para evitar la conversión de un entorno aerobio a uno anaerobio, se airearon los cultivos con 20 vvm de aire y se agitó a 500 rpm. Para compensar la insuficiencia de nutrientes para el crecimiento bacteriano durante la fermentación, se complementaron los cultivos con glucosa y extractos de levaduras de acuerdo con los estados de fermentación de las bacterias. Cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO₆₀₀ de 80, se añadió un inductor, IPTG, a los cultivos para inducir la expresión de proteínas. Se cultivaron los cultivos adicionalmente durante de 40 a 45 h para incrementar el valor de DO a 600 nm hasta de 100 a 120.

La expresión de inmunoglobulina Fc, la formación de cuerpos de inclusión, y la formación de dímeros del Fc de Ig expresado en los transformantes de *E. coli* se examinaron como sigue. Para investigar la expresión intracelular global de las regiones Fc de inmunoglobulina, se mezclaron partes de las soluciones fermentadas con volúmenes iguales de tampón de muestra de proteína 2x y se sometió a electroforesis en un gel SDS-PAGE al 15 % (Criterion Gel, Bio-Rad). Como resultado, se observó que el Fc de inmunoglobulina se sobreexpresaba en todos los transformantes producidos. A continuación, se rompieron las células usando un ultrasonificador (Misonix Company). Se centrifugó el lisado celular así obtenido para separar las sustancias solubles en agua de las sustancias insolubles en agua. Se descubrió que la mayoría de las sustancias sobreexpresadas existían como cuerpos de inclusión, medido por electroforesis en SDS-PAGE al 15 %. Los cuerpos de inclusión se sometieron al siguiente procedimiento de replegado para examinar hasta qué grado se replegó el Fc y si se formaron y hasta qué grado las regiones Fc diméricas. Se sometieron a ultrasonificación 10 g de la solución fermentada en 100 ml de un tampón de lisis (Tris 10 mM, pH 9,0, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,5 %, NaCl 0,2 M) para romper las células. La centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min dividió el lisado celular en una fracción soluble en agua y una fracción insoluble en agua como un cuerpo de inclusión. Se disolvieron 2 g de este cuerpo de inclusión en una mezcla de 20 ml de Tris 1 M (pH 9,0) y 20 ml de un tampón de solubilización (guanidina 6 M, Tras 50 mM) y se dejó que reaccionara mientras se agitaba suavemente a 4 °C durante 30 min. Después de que se completara la reacción, se mezcló la solución del cuerpo de inclusión durante la noche con 10 volúmenes de un tampón de replegado (urea 2 M, Tras 50 mM, arginina 0,25 M, cisteína 3 mM, pH 9,0) con agitación suave. A esta mezcla se le añadió un tampón de muestra de proteína libre de cualquier agente reductor, tal como DTT o beta-mercaptoetanol, seguido de electroforesis en SDS-PAGE al 15 % (Criterion Gel, Bio-Rad). Se visualizaron las bandas de proteína con un colorante tal como Coomassie Brilliant. La FIG. 1 es una fotografía tomada de un gel en el que se hicieron correr proteínas replegadas de los cuerpos de inclusión expresados por el reformante HM11201 a 32 °C (carril 1) y 28 °C (carril 2), por HM11200 a 28 °C (carril 3) y 32 °C (carril 4), por HM11204 a 28 °C (carril 5) y 32 °C (carril 6), y por HM11205 a 32 °C (carril 7) y 28 °C (carril 8) en presencia de un campo eléctrico, junto con una proteína Fc, como control, purificada a partir de *E. coli* de acuerdo con un procedimiento convencional (carril C). Como se observa en la FIG. 1, una porción significativa de las proteínas totales se atribuye a la proteína Fc, de la que gran parte existe en forma dimérica después de replegarse. Sin embargo, las proteínas Fc difieren en la proporción de dímeros con respecto a monómeros de un transformante a otro, esto es, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos N terminal expresada por el transformante. Por ejemplo, una porción significativa de las proteínas Fc de HM11201, que comienza con Met-Pro-Ser-Cys-Pro-CH2-CH3 (Met-[SEQ ID NO:19]), existe en forma dimérica. Casi todas las proteínas Fc de HM11205, que comienzan con Met-Cys-Pro-CH2-CH3 (Met-[SEQ ID NO:21]), existen como monómeros, pero ninguna existe en forma dimérica. Se cree que esto debe atribuirse al hecho de que la especificidad del procesamiento de la aminopeptidasa en células huésped de *E. coli* varía dependiendo de la secuencia N terminal de Fc.

<I-3> Análisis de secuencia N terminal

Los fragmentos de región Fc diméricos replegados de los cuerpos de inclusión son diferentes en la secuencia de aminoácidos del tipo natural debido a la presencia del residuo de metionina inicial. Para determinar si el residuo de

metionina se procesa por proteasas de *E. coli*, se analizaron secuencias de aminoácidos N terminales de las proteínas por el Basic Science Research Institute, Seúl, Corea. Las muestras usadas en el análisis de secuencia de aminoácidos N terminal se prepararon como sigue.

En primer lugar, se sumergió una membrana de PVDF (Bio-Rad) en metanol durante aproximadamente 2-3 s para activarlo, y se humedeció suficientemente con un tampón de bloqueo (glicina 170 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), metanol al 20 %). Las muestras de proteínas separadas en un gel SDS-PAGE no reductor, preparadas en el ejemplo <1-2>, se sometieron a transferencia de bandas sobre una membrana PVDF durante aproximadamente una hora usando un kit de transferencia de bandas (Hoefer Semi-Dry Transfer unit, Amersham). Las proteínas transferidas sobre la membrana de PVDF se tiñeron con un colorante de proteína, Coomassie Blue R-250 (Amresco), durante un momento (3-4 s), y se lavaron con una solución de decoloración (agua:ácido acético:metanol =5: 1: 4). A continuación, se cortaron los fragmentos de membrana que contienen las proteínas con tijeras y se sometieron a análisis de secuencia N terminal.

Como resultado, se descubrió que las proteínas Fc de IgG4 que incluyen una región bisagra tenían una secuencia N terminal de Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys Pro-Ser-Cys-Pro-CH2-CH3 [SEQ ID NO: 17. Las secuencias de aminoácidos y las secuencias N terminales de las proteínas expresadas en los transformantes se dan en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

Transformantes	Secuencias N terminales Met-[SEQ ID NO:]-CH2-	Resultados del análisis de secuencias	
		Dímero	Monómero
HM11200	Met-Ser-Cys-Pro-CH2- [18]	Ser-Cys-Pro-CH2	Pro-CH2
HM11201	Met-Pro-Ser-Cys-Pro-CH2-[19]	Pro-Ser-Cys-Pro-CH2	Pro-Ser-Cys-Pro-CH2
HM11204	Met-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro-CH2 [20]	Pro-Ser-Cys-Pro-CH2	mezclado
HM11205	Met-Cys-Pro-CH2-CH3 [21]	-	Pro-CH2

Los datos del análisis de secuenciación de aminoácidos reveló que se procesaron los fragmentos Fc replegados de los cuerpos de inclusión producidos por los transformantes de *E. coli* utilizados en la presente invención para tener una secuencia N terminal precisa desprovista del residuo de metionina inicial. El producto de proteína que permanece en forma monomérica aún después del replegado está privado de residuos cisteína, y por tanto, no puede formar dímeros. Además, como es evidente de la FIG. 1, la porción de monómero en los fragmentos Fc replegados difiere de un transformante a otro, y no existen dímeros en HM11205. Estos resultados indican que la secuencia de aminoácidos del sitio N terminal tiene una gran influencia sobre el procesamiento del extremo N terminal, de modo que se puede obtener una proteína que tenga una secuencia N terminal deseada modulando la secuencia N terminal. Las proteínas, aún si tienen la misma secuencia de aminoácidos, se pueden procesar de forma diferente dependiendo de las condiciones de cultivo de las células huésped de *E. coli*, en especial la temperatura del cultivo, como se reveló por medio de las siguientes pruebas. El HM11200, cuando se hizo crecer a bajas temperaturas (28 °C~32 °C), expresó la proteína de fusión Fc en forma solubilizada en la misma cantidad que en forma de cuerpo de inclusión. La forma solubilizada de la proteína de fusión Fc existió como monómero desprovisto de la secuencia de aminoácidos N terminal Met-Ser-Cys. Por tanto, los presentes inventores reconocieron que se puede obtener una proporción controlada de fragmentos Fc de inmunoglobulina monoméricos y diméricos modulando la secuencia de aminoácidos N terminal de la proteína Fc de fusión y la condición del cultivo de células huésped.

Para determinar cuantitativamente la expresión de regiones Fc de inmunoglobulina en los transformantes de *E. coli*, se purificaron regiones Fc de inmunoglobulina de la solución de replegado usando una columna de afinidad de proteína-A conocida por tener una fuerte afinidad para inmunoglobulinas, como sigue.

Se replegaron los cuerpos de inclusión recogidos por centrifugación, y a continuación se purificaron por medio de cromatografía en columna. Después de que se equilibraran 5 ml de una columna de afinidad de proteína A (Pharmacia) con PBS, se cargaron los lisados celulares en la columna a un caudal de 5 ml/min. Se separaron por lavado las proteínas no unidas con PBS, y se eluyeron la proteínas unidas con citrato 100 mM (pH 3,0). Se desalaron las fracciones recogidas usando una columna de desalado HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón Tris 10 mM (pH 8,0). A continuación, se llevó a cabo una cromatografía en columna de intercambio aniónico secundaria usando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia). Se cargaron las regiones de Fc de inmunoglobulina recombinante purificadas primarias en la columna Q-Sepharose HP 26/10 (pharmacia), y se eluyó la columna con un gradiente lineal (NaCl 0-0,2 M) en tampón Tris 10 mM (pH 8,0), proporcionando así fracciones altamente puras. Después de purificarse parcialmente usando la columna de afinidad de proteína A, se determinaron los niveles de expresión de las regiones Fc de Ig recombinante, y los resultados se dan en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Plásmidos	Transformantes	Rendimientos de expresión después de purificación de proteína-A
pmSCPFC	HM11200	5-6 g/l
pmPSCFC	HM11201	4-5 g/l
pmCPSFC	HM11204	4-5 g/l
pmCPFC	HM11205	3-4 g/l

Ejemplo 2: Construcción del vector de expresión de la región Fc de inmunoglobulina IgG1 humana, expresión y purificación de la región Fc de IgG1, y análisis de secuencia N terminal

5 <2-I> Construcción del vector de expresión de la región Fc de IgG1

Para clonar una región Fc de cadena pesada que incluye la región bisagra de inmunoglobulina IgG1 humana, se llevó a cabo una RT-PCR de la misma manera que en el ejemplo <1-1>. Para amplificar genes que tienen secuencias N terminales diferentes, se usaron los siguientes cebadores.

Tabla 3

Secuencia de cebadores en 5' usados

	Secuencia de cebador 5' [SEQ ID NO:]
MEPK	5'GGA ATT CCA TAT GGA GCC CAA ATC TTG TGA CAA AAC TCA C 3' [61]
MSCD	5'GGA ATT CCA TAT GTC TTG TGA CAA AAC TCA CAC ATG CCC 3' [62]
MDKT	5'GGA ATT CCA TAT GGA CAA AAC TCA CAC ATG CCC ACC GTG C 3' [63]
MCPA	5'GGG AAT TCC ATA TGT GCC CAG CAC CTG AAC TCC TGG GG [64]
MPKS	5'GGG AAT TCC ATA TGC CCA AAT CTT GTG ACA AAA CTC AC [65]
MCPP	5'GGG AAT TCC ATA TGT GCC CAC CGT GCC CAG CAC CTG AAC TCC [66]
MPPC	5'GGA ATT CCA TAT GCC ACC GTG CCC AGC ACC TGA ACT CCT G 3' [67]
MPCP	5'GGA ATT CCA TAT GCC GTG CCC AGC ACC TGA ACT CCT GGG G 3' [68]

- 10 Como para el cebador 3', presentó la secuencia de 5' -CGC GGA TCC TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GCT CTT C-3' [SEQ ID NO: 69] y se usó para la amplificación de todos los genes con secuencias N terminales diferentes. Para facilitar un procedimiento de clonación génica posterior, se introdujo un sitio de reconocimiento Nde I en cada uno de los cebadores en 5', y un sitio de reconocimiento BamHI en el cebador en 3'. Los productos de región Fc
- 15 designados por tener partes de la secuencia de aminoácidos total Glu-Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro [SEQ ID NO: 14] de la región bisagra de IgG1 como sigue. El plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador de MEPK se denominó pMEPKFc1, y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG1, comenzando con Met-Glu-Pro-Lys (Met-[SEQ ID NO: 48]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 22, correspondiente a la
- 20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 23. El plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador de MSCD se denominó pMSCKFc1, y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG1, comenzando con Met-Ser-Cys-Asp (Met-[SEQ ID NO: 49]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 24, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 25. Un plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador de MDKT se denominó pMDKTFc1, y se ancló al mismo una secuencia de ADN que
- 25 codifica el CH2 y CH3 de IgG1, comenzando con Met-Asp-Lys-Thr (Met-[SEQ ID NO: 50]), que se analizó por medio de

secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 26, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 27. Un plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador de MCPA se denominó pMCPAFc1, y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG1, comenzando con Met-Cys-Pro (Met-[SEQ ID NO: 51]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 28, que corresponde a SEQ ID NO. 29. Un plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador MPKS se denominó pMPKSFc1, y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG1, comenzando con Met-Pro-Lys-Ser (Met-[SEQ ID NO: 52]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 30, que corresponde a SEQ ID NO. 31. Un plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador de MCPP se denominó pMCPPFc1, y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG1, comenzando con Met-Cys-Pro-Pro (Met-[SEQ ID NO: 53]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 32, que corresponde a SEQ ID NO. 33. Un plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador de MPPC se denominó pMPPCFc1, y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG1, comenzando con Met-Pro-Pro-Cys (Met-[SEQ ID NO: 54]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 34, que corresponde a SEQ ID NO. 35. Un plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador de MPCP se denominó pMPCPFc1, y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG1, comenzando con Met-Pro-Cys-Pro (Met-[SEQ ID NO: 55]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 36, correspondiente a SEQ ID NO. 37. Los vectores de expresión se transformaron en BL21 (DE3) de *E. coli* para preparar transformantes respectivamente designados como BL21/pMEPKFc1(HM11206), BL21/pMSCDFc1(HM11207), BL21/pMDKTFc1(HM11208), BL21/pMCPAFc1(HM11209) BL21/pMPKSFc1(HM11210), BL21/pMCPPFc1(HM11211), BL21/pMPPCFc1(HM11212) y BL21/pMPCPFc1(HM11213).

<2-2> Expresión y purificación de Fc de IgG1

Como en el caso de IgG4, los transformantes bacterianos preparados en el ejemplo <2-1> se inocularon en fermentadores respectivos (Marubishi Company) y se dejó que crecieran, seguido de la determinación de si expresaban los fragmentos de región Fc de inmunoglobulina.

En primer lugar, se hizo crecer cada transformante en 100 ml de medio LB con agitación durante la noche y se inoculó en el fermentador para un cultivo a gran escala. Se mantuvo el fermentador a 28 °C o 35 °C. Para evitar la conversión de un entorno aerobio a uno anaerobio, se airearon los cultivos con 20 vvm de aire y se agitó a 500 rpm. Para compensar la insuficiencia de nutrientes para el crecimiento bacteriano durante la fermentación, se complementaron los cultivos con glucosa y extractos de levaduras de acuerdo con los estados de fermentación de las bacterias. Cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO₆₀₀ de 80, se añadió un inductor, IPTG, a los cultivos para inducir la expresión de proteínas. Se cultivaron los cultivos adicionalmente durante de 40 a 45 h para incrementar el valor de DO a 600 nm hasta de 100 a 120.

La expresión de inmunoglobulina Fc, la formación de cuerpos de inclusión, y la formación de dímeros del Fc de Ig expresado en los transformantes de *E. coli* se examinaron como sigue. Para investigar la expresión intracelular global de las regiones Fc de inmunoglobulina, se alicuotaron las soluciones fermentadas antes y después de la inducción.

Se mezclaron partes de las soluciones fermentadas con volúmenes iguales de tampón de muestra de proteína 2x y se sometió a electroforesis en un gel SDS-PAGE al 15 % (Criterion Gel, Bio-Rad) en las siguientes condiciones reductoras. Los resultados de la electroforesis se dan en la FIG. 7. Se hizo correr un control de Fc de IgG4 en el carril 1, mientras que los niveles de expresión del transformante HM11208 de acuerdo con el tiempo se muestran en los carriles 2 a 4 y los niveles de expresión del transformante HM11206 de acuerdo con el tiempo en los carriles 5 a 7. Los niveles de expresión en los transformantes HM11207, HM11212, HM11209, HM11210, HM11213 y HM11211 se muestran en los carriles 8 a 13, respectivamente. Como se observa en la FIG. 7, una única banda de 30 kDa (región Fc), que no se observó antes de la inducción de IPTG, apareció de forma muy clara en todas las muestras sometidas a inducción de IPTG, lo que indica que se expresaron las regiones Fc de IgG1 recombinante en contraste con el control G4Fc. Además, se sobreexpresaron las regiones Fc, ascendiendo a al menos aproximadamente un 30 % de la cantidad total de proteínas expresadas.

Para determinar cuantitativamente la expresión de regiones Fc de inmunoglobulina en los transformantes de *E. coli*, se purificaron regiones Fc de inmunoglobulina de la solución de replegado usando una columna de afinidad de proteína-A conocida por tener una fuerte afinidad para inmunoglobulinas de la misma manera que se usó para Fc de IgG4.

De los transformantes, se midió el transformante de plásmido pMSCDFc para tener la mayor tasa de expresión, que ascendía hasta 340 mg por 10 g de cuerpo de inclusión, mientras que los transformantes pMDKTFc, pMEPKFc, pMPPCFc y pMPCPFc mostraron tasas de expresión de 133,3 mg, 159 mg, 110 mg y 120 mg, respectivamente.

Se midió el contenido de Fc de IgG1 dimérico en los productos expresados de la misma manera que se usó para el contenido de Fc de IgG4 dimérico. Se rompieron las células de las soluciones de fermentación usando un ultrasonificador (Misonix Company). Se centrifugó el lisado celular así obtenido para separar las sustancias solubles en agua de las sustancias insolubles en agua. Se descubrió que la mayoría de las sustancias sobreexpresadas existían como cuerpos de inclusión, medido por electroforesis en SDS-PAGE al 15 %. Se replegaron los cuerpos de inclusión para examinar hasta qué grado se replegó el Fc y si se formaron y hasta qué grado las regiones Fc diméricas. Se purificaron las proteínas Fc replegadas usando una columna de afinidad de proteína-A y se mezclaron con un tampón

de muestra de proteína libre de agente reductor, tal como DTT o beta-mercaptoetanol, seguido de electroforesis en SDS-PAGE al 15 % (Criterion Gel, Bio-Rad). Se visualizaron las bandas de proteína con un colorante tal como Coomassie Brilliant.

La FIG. 8 es una fotografía tomada de un gel en el que se hicieron correr los aislados de la columna de proteína-A de las proteínas replegadas a partir de los cuerpos de inclusión expresados por el reformante HM11208 (carril 1), por el reformante HM11206 (carril 2), por el reformante HM11207 (carril 4), por el reformante HM11212 (carril 5) y por el reformante HM11213 (carril 7) en presencia de un campo eléctrico en una condición no reductora, junto con una proteína Fc de IgG4 usada como control (carriles 3, 6, y 8). Como se muestra en la FIG. 8, se descubrió que todos los fragmentos Fc de IgG1 usados en la muestra forman dímeros, aunque la cantidad de los mismos difería en cierto grado.

<2-3> Análisis de secuencia N terminal

Como se reconoce en el caso de Fc de IgG4, la secuencia de aminoácidos N terminal determinó el procesamiento postraducciona en cuanto a si permaneció el residuo de metionina inicial o si se procesó con precisión el residuo de metionina inicial, o junto con otros residuos para dar secuencias de aminoácidos diferentes de la deseada. Para examinar si el residuo de metionina se procesó por proteasas de *E. coli*, se analizaron diferentes secuencias de aminoácidos N terminales de las regiones Fc de IgG1 por el Basic Science Research Institute, Seúl, Corea. Los resultados del análisis se resumen en la tabla 4, a continuación.

Tabla 4

Transformantes	Resultados de secuenciación N terminal (dímeros)
HM11208	Met
HM11206	Met
HM11207	Ser
HM11212	Pro
HM11213	Pro

Como se observa en la tabla 4, el residuo de metionina inicial permanece sin procesar en los transformantes de HM11208 y HM11206, en los que se sobreexpresaron las regiones Fc de IgG1 en formas diméricas mientras los productos fermentados de HM11207, HM11212 y HM11213 no tienen residuos de metionina iniciales como resultado del procesamiento postraducciona preciso.

Tomados juntos, los datos obtenidos por medio de los experimentos mencionados anteriormente indican que cuando se expresa una región Fc de IgG1 en *E. coli*, la secuencia N terminal de la misma determina la expresión, el nivel de expresión, la proporción de dímero y el procesamiento N terminal de la misma, y esas regiones Fc desprovistas de residuos de metionina iniciales se pueden producir en una escala en masa aprovechando la secuencia N terminal. Las regiones Fc de IgG1 obtenidas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para potenciar la semivida en suero y la actividad fisiológica del polipéptido fisiológicamente activo unido a las mismas sin inducción de respuesta inmunitaria debida a la adición de residuos de aminoácidos exógenos.

Ejemplo 3: Construcción del vector de expresión de la región Fc de inmunoglobulina IgG2 humana

<3-1> Construcción del vector de expresión de la región Fc de IgG2

Para clonar una región Fc de cadena pesada que incluye la región bisagra de IgG2, se llevó a cabo una RT-PCR de la misma manera que se usó para la región Fc de IgG4. Para amplificar genes que tienen secuencias N terminales diferentes, se usaron los siguientes cebadores.

Tabla 5

	Secuencias de cebador 5' [SEQ ID NO:]
G2MPPCSS	5' GGG AAT TCC ATA TGC CAC CGT GCC CAG CAC CAC CTG TGG CAG G 3' [70]
G2MPCPSS	5' GGG AAT TCC ATA TGC CGT GCC CAG CAC CAC CTG TGG CAG GAC 3' [71]
G2MCPSS	5' GGG AAT TCC ATA TGC GCC CAG CAC CAC CTG TGG CAG GAC 3' [72]
G2MCCVSS	5' GGG AAT TCC ATA TGC GTT GTG TCG AGT GCC CAC CGT GCC CAG C 3' [73]
G2MCVESS	5' GGG AAT TCC ATA TGC GTG TCG AGT GCC CAC CGT GCC CAG CAC C 3' [74]

El cebador 3', presentó la secuencia de 5' -CGC GGA TCC TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GCT CTT C-3' [SEQ ID NO: 75] y se aplicó para la amplificación de todos los genes con secuencias N terminales diferentes. Para facilitar un procedimiento de clonación génica posterior, se introdujo un sitio de reconocimiento Nde I en cada uno de los cebadores en 5', y un sitio de reconocimiento BamHI en el cebador en 3'. Los productos de región Fc amplificados con pares de cebadores se insertaron en un vector, dando así los respectivos plásmidos recombinantes designados por tener partes de la secuencia de aminoácidos total Glu-Arg-Lys-Cys-Cys-Val-Glu-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro [SEQ ID NO: 15] de la región bisagra de IgG2, como sigue. El plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador de G2MPPCSS se denominó pmPPCG2Fc, y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG2, comenzando con Met-Pro-Pro-Cys (Met-[SEQ ID NO: 56]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 38, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 39. El plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador G2MPCPSS se denominó pmPCPG2Fc y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG2, comenzando con Met-Pro-Cys-Pro (Met-[SEQ ID NO: 57]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 40, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 41. Un plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador G2MCPSS se denominó pmCPG2Fc y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG2, comenzando con Met-Cys-Pro (Met-[SEQ ID NO: 58]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 42, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 43. Un plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador G2MCCVSS se denominó pmCCVG2Fc, y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG2, comenzando con Met-Cys-Cys-Val-Glu-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro (Met-[SEQ ID NO: 59]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 44, que correspondía a SEQ ID NO. 45. Un plásmido que contenía un gen amplificado con el cebador G2MCVESS se denominó pmCVEG2Fc y se ancló al mismo una secuencia de ADN que codifica el CH2 y CH3 de IgG2, comenzando con Met-Cys-Val-Glu-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro (Met-[SEQ ID NO: 60]), que se analizó por medio de secuenciación de bases para tener SEQ ID NO. 46, que corresponde a SEQ ID NO. 47. Los vectores de expresión se transformaron en BL21 (DE3) de *E. coli* para preparar transformantes designados respectivamente BL21/pmPPCG2Fc (HM11206), BL21/pmPCPG2Fc (HM11207), BL21/pmCPG2Fc (HM11216), BL21/pmCCVG2Fc (HM11217) y BL21/pmCVEG2Fc (HM11218).

<3-2> Expresión, purificación y análisis de la secuencia N terminal de Fc de IgG2

Como en el caso de IgG4, los transformantes bacterianos preparados en el ejemplo <3-1> se inocularon en fermentadores respectivos (Marubishi Company) y se dejó que crecieran, seguido de la determinación de si expresaban los fragmentos de región Fc de inmunoglobulina. Las condiciones de cultivo no eran significativamente diferentes de las establecidas para Fc de IgG4. Se descubrió que los fragmentos de región Fc de IgG2 se sobreexpresaron en varias condiciones, incluyendo temperatura, composición del medio, concentración inductora, etc. medido por SDS-PAGE en una condición reductora. La FIG. 9 muestra el resultado de un SDS-PAGE al 15 % de las soluciones de fermentación mezclado con volúmenes iguales de tampón de muestra de proteína 2x. Se usó un fragmento Fc de IgG4 como control en el carril 1 mientras se hicieron correr los fragmentos expresados por el HM11214, HM11215, HM11216, HM11217 y HM11218 en los carriles 2 a 6, respectivamente. Como se observa en la FIG. 9, los cinco transformantes usados en el experimento sobreexpresaron los fragmentos Fc.

Se midió el contenido de Fc de IgG4 dimerico en los productos expresados de la misma manera que se describió anteriormente. Se rompieron las células de las soluciones de fermentación y se replegaron las sustancias insolubles en agua del lisado celular, después de eso sólo se purificaron los fragmentos de región Fc usando una columna de afinidad de proteína-A. Se mezclaron los productos de expresión purificados con un tampón de muestra de proteína, tal como DTT o beta-mercaptoetanol, y se separaron en un SDS-PAGE al 15 % (Criterion Gel, Bio-Rad). Se visualizaron las bandas de proteína con un colorante tal como Coomassie Brilliant. La FIG. 10 muestra el resultado de la electroforesis. Se usó un fragmento Fc de IgG4 como control en los carriles 1 y 7 mientras que se observaron

dímeros del fragmento del HM11214, HM11215, HM11216, HM11217, y HM11218 en los carriles 2 a 6. Como se entiende de los datos de la FIG. 10, los productos de expresión de los transformantes, aunque son diferentes entre sí con respecto a la secuencia N terminal o condición de expresión, todos pueden formar dímeros.

5 Para examinar si el residuo de metionina se procesa por proteasas de *E. coli*, se analizaron diferentes secuencias de aminoácidos N terminales de las regiones Fc de IgG4 dimérico por el Basic Science Research Institute, en Seúl, Corea. Se retiró el residuo de metionina inicial de los productos de los transformantes HM11214 y HM11215, de los que ambos tienen un residuo prolina en la posición 2.

10 Como es evidente de estos experimentos, las regiones Fc de IgG2 se pueden expresar en una escala en masa en *E. coli*. Además, los datos obtenidos en los experimentos mencionados anteriormente indican que la secuencia N terminal de una región Fc de IgG1 determina la expresión, el nivel de expresión, la proporción de dímero y el procesado N terminal de la misma, y esas regiones Fc desprovistas de residuos de metionina iniciales se pueden producir en una escala en masa aprovechando la secuencia N terminal. Las regiones Fc de IgG1 obtenidas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para potenciar la semivida en suero y la actividad fisiológica del polipéptido fisiológicamente activo unido a las mismas sin inducción de respuesta inmunitaria debida a la adición de residuos de aminoácidos exógenos.

Ejemplo 4: Ensayo de unión a C1q usando ELISA

20 Para determinar si los derivados preparados en el ejemplo <1-2> y las proteínas correspondientes a las regiones Fc de las inmunoglobulinas, expresadas en los transformantes de *E. coli* y purificadas, se unen a C1q humana, se llevó a cabo un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) como sigue. Como grupos de prueba, se usaron regiones Fc de inmunoglobulina producidas por los transformantes HM11200 y HM11201 preparados en los ejemplos anteriores. Como estándar, se usó una inmunoglobulina glucosilada (IVIGG-globulin S, Green Cross PBM). Se prepararon muestras de prueba y estándar en tampón carbonato 10 mM (pH 9,6) a una concentración de 1 µg/ml. Se tomaron alícuotas de las muestras en una placa de 96 pocillos (Nunc) en una cantidad de 200 ng por pocillo, y se recubrió la placa durante la noche a 4 °C. A continuación, se lavó tres veces cada pocillo con PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Tween 20 al 0,05 %), se bloqueó con 250 µl de un tampón de bloqueo (seroalbúmina bovina al 1 % en PBS-T) a temperatura ambiente durante 1 h, y se lavó de nuevo con el mismo PBS-T tres veces. Se diluyeron las muestras estándar y de prueba en PBS-T hasta una concentración predeterminada y se añadieron a pocillos recubiertos de anticuerpo, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 h y se lavó con PBS-T tres veces. Después de esto, se añadieron 2 µg/ml de C1q (R&D Systems) a la placa y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h, y se lavó la placa con PBS-T seis veces. Se añadieron a cada pocillo 200 µl de un dilución 1:1000 de un conjugado anticuerpo anti-C1q humana humano-peroxidasa (Biogenesis, EE. UU.) en el tampón de bloqueo y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h. Después de que se lavara cada pocillo con PBS-T tres veces, se mezclaron volúmenes iguales de reactivos colorantes A y B (Color A: peróxido estabilizado y Color B: cromógeno estabilizado; DY 999, R&D Systems), y se añadieron 200 µl de la mezcla a cada pocillo, seguido de incubación durante 30 min. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de una solución de terminación de reacción, ácido sulfúrico 2 M. Se leyó la placa usando un lector de microplacas (Molecular Device). Se midió la absorbancia de las muestras estándar y de prueba a 450 nm, y los resultados se dan en la FIG. 2.

40 Como se muestra en la FIG. 2, las proteínas de región Fc de inmunoglobulina producidas en *E. coli* de acuerdo con la presente invención presentaron una reducción marcada en la afinidad de unión a C1q. Estos resultados indican que las proteínas de región Fc de inmunoglobulina producidas por la presente invención rara vez presentan el riesgo de inducir respuestas inmunitarias tales como citotoxicidad e inflamación en el cuerpo cuando se usa un vehículo para polipéptidos fisiológicamente activos en una forma conjugada.

Ejemplo 5: Ensayo de unión a FcγRI, FcγRII y FcRnαβ₂ usando ELISA

45 Se sabe que el Fc de inmunoglobulina se une a los receptores de hematocitos a FcγRI y FcγRIII para mediar en las funciones efectoras tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpo. Para determinar si el Fc de inmunoglobulina producido en *E. coli* media en dichas funciones efectoras, se obtuvo cada uno de los receptores y se sometió a ensayo para determinar la capacidad de unión por medio de un ELISA. Además, se sometió a ensayo el Fc de inmunoglobulina para determinar la unión al receptor FcRn, que se sabe que tiene influencia sobre el metabolismo *in vivo* de inmunoglobulina, de la misma manera.

50 <5-1> Construcción de cepas de expresión de FcγRI/ FcγRIII y FcRnαβ₂ humanos

55 Se aisló ARN total de células mononucleares de sangre periféricas humanas usando un kit (Qiagen), y se usó para buscar genes que codifican dominios de unión a ligandos extracelulares de FcγRI, FcγRIII y FcRnαβ₂ humanos por medio de RT-PCR y PCT. Se fusionaron los genes a un gen GST (glutathión S-transferasa) y se clonaron en vectores de expresión de células de mamíferos respectivos anclando a los mismos un gen deshidrofolato reductasa. Se transfectó el plasma pHM000 recombinante así preparado en células CHO. A este respecto, se inocularon células CHO en un recuento de 1x10⁶ células por placa de cultivo de 6 cm, se incubó a 37 °C o 24 horas en una incubadora con CO₂ al 5 %, y se lavó dos veces con Opti-MEM (Gibco., n.º Cat. 31985-070). Se mezcló un 1 ml de Opti-MEM que contenía 10 µg de pHM000 con 1 ml de reactivo Lipofectamine™ (Invitrogen, n.º Cat. 18324-020). Después de que se dejara en

reposo durante 20 min, se añadió la mezcla resultante a las células CHO preparadas. Se incubaron estas células a 37 °C durante 18 horas en una incubadora con CO₂ al 5 % y se refrescaron con DMEM/F12, complementado con suero fetal bovino al 10 % y penicilina-estreptomicina al 1 %, antes de la incubación durante 48 horas adicionales. Para seleccionar cepas transformadas, se trataron las células con tripsina al 0,5 % (Gibco., n.º Cat. 15400-054) en el medio de selección α -MEM (Welgene, n.º Cat. LM008-02) que incluía suero fetal bovino dializado al 10 %, penicilina-estreptomicina al 1 %, y 800ug/ml de geneticina (Mediatech, n.º Cat. 61-234RG), seguido de centrifugación. Se transfectaron las células así transformadas a una placa de cultivo T25 (Nunc) y se cultivó a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 % hasta una confluencia de un 90 % o mayor. Para determinar los niveles de expresión de Fc γ RI, Fc γ RIII y FcRn $\alpha\beta_2$, se incubaron las cepas seleccionadas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 % con concentraciones incrementadas de MTX (Sigma, n.º Cat. M-8407) de 20 nM por un incremento de 20 nM cada dos semanas.

<5-2> Producción y purificación de Fc γ RI, Fc γ RIII y FcRn $\alpha\beta_2$ humanos

Se purificaron los Fc γ RI, Fc γ RIII y FcRn $\alpha\beta_2$ como sigue. Se inocularon las cepas de células seleccionadas en Cell Factory (Nunc, n.º Cat. 170009) en un recuento de $3,5 \times 10^8$ células por fábrica se dejó que crecieran a 37 °C durante 48 horas en una incubadora de CO₂ al 5 %, y a continuación se lavó dos veces con 1 litro de PBS por fábrica. Se complementaron las células con 1 litro del medio de producción CHO-A-SFM que contenía butirato de sodio 0,3 mM (Sigma, n.º Cat. B-5887) y se cultivó a 33 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %, durante esto se recuperó el sobrenadante de expresión cada dos días 7 veces en total. Se centrifugó el sobrenadante recogido, se filtró a través de un sistema de filtración de 0,22 μ m (Corning), se concentró usando un sistema de concentración (PALL, n.º Cat. PN OS010C70), y se cargó en resina Sepharose FF quelante (Amersham Pharmacia, n.º Cat. 17-0575-02) se cargó con sulfuro de níquel 0,1 M (Sigma, n.º Cat. N4887), de modo que los GST de Fc γ RI, Fc γ RIII, y FcRn $\alpha\beta_2$ se unieron al níquel. Se separaron los Fc γ RI, Fc γ RIII, y FcRn $\alpha\beta_2$ unidos y se purificó a partir de la columna usando NaPi(pH 8,0) 50 mM, NaCl 300 mM, y imidazol 250 mM.

<5-3> Ensayo de unión a Fc γ RI

Se diluyó el Fc γ RI purificado en el ejemplo <5-2> hasta una concentración de 0,75 μ g/ml en PBS (pH 7,4), se alicuotó en una placa de 96 pocillos (Nunc, Maxisorp) en una cantidad de 100 μ l por pocillo, y se incubó durante 18 horas a 4 °C de modo que el receptor se unió al fondo de la placa de 96 pocillos. Se lavó tres veces cada pocillo de la placa de 96 pocillos con 300 μ l de un tampón de lavado PBS (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,05 % (Amresco, n.º Cat. 0777). A continuación, se añadieron 300 μ l de PBS (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,1 % y BSA al 3 % (seroalbúmina bovina, Amresco, n.º Cat. 0332) a cada pocillo para evitar la unión no deseada de otras sustancias al fondo del pocillo y se incubó a 37 °C durante 1 hora, después de esto la solución de reacción se retiró completamente de los mismos. Con la IgG sérica humana y el Fc separados por el tratamiento de IgG sérica humana sirviendo la papaína como controles, se diluyeron HM11200 y el producto de HM11201 purificado en el ejemplo 2 hasta una concentración de 9 μ g/ml en tampones de ensayo respectivos, seguido de la repetición de la dilución en serie 1:3 con el tampón de ensayo siete veces. Se colocaron 100 μ l de la dilución en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se dejó que reaccionara a 25 °C durante 2 horas con agitación a una tasa constante, y los pocillos se lavaron seis veces con un tampón de lavado. Para examinar si el HM11200, el producto de HM11201 y los controles, de los que todos se anclaron al fondo de la placa de pocillos, se unieron a Fc γ RI, se colocó una dilución 1:100000 de un anticuerpo de cadena pesada anti-humano de cabra conjugado con HRP (Chemicon, AP309P) en un tampón de ensayo en un volumen de 100 μ l en cada pocillo y se dejó que reaccionara a 25 °C durante 2 horas con agitación a una tasa constante. Después de lavar seis veces con un tampón de lavado, se colocaron 100 μ l de un sustrato (BD bioscience, n.º Cat. 555214), que podía reaccionar con la HRP conjugada con el anticuerpo, en cada pocillo y se hizo reaccionar a 25 °C durante 20 min. Se terminó la reacción con ácido sulfúrico 2 N y se midió la intensidad de color con un lector de ELISA (Molecular Devices, lector de microplacas) a 450 nm. Como se observa en la FIG. 3, casi ninguna de las proteínas Fc producidas en *E. coli* se unieron a Fc γ RI mientras que la IgG humana y Fc, ambos glucosilados, se asociaron fuertemente con Fc γ RI.

<5-4> Ensayo de unión a Fc γ RIII

Con la IgG sérica humana y el Fc separados por el tratamiento de IgG sérica humana sirviendo la papaína como controles, se diluyeron HM11200 y el producto de HM11201 purificado en el ejemplo <1-2> hasta una concentración de 9 μ g/ml en el tampón carbonato respectivo (pH 9,0), seguido de la repetición de la dilución en serie 1:3 con el tampón carbonato siete veces. Se colocaron 100 μ l de la dilución en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubó a 4 °C durante 18 horas de modo que se unieron al fondo de la placa de 96 pocillos. Se lavó tres veces cada pocillo de la placa de 96 pocillos con 300 μ l de un tampón de lavado que consistía en PBS (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,05 % (Amresco, n.º Cat. 0777). A continuación, se añadieron 300 μ l de un tampón de ensayo que consistía en PBS (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,1 % y leche en polvo desnatada al 5 % (Difco, n.º Cat. 232100) a cada pocillo para evitar la unión no deseada de otras sustancias en el fondo del pocillo, y se incubó a 37 °C durante 1 hora, seguido de la retirada completa de la solución de reacción. Se diluyó el Fc γ RIII purificado en el ejemplo <4-2> hasta una concentración de 1 μ g/ml en la solución de ensayo. Se colocaron 100 μ l de la dilución en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se dejó que reaccionara a 25 °C durante 2 horas con agitación a una tasa constante. Se lavaron los pocillos seis veces con un tampón de lavado. Se diluyó 1:10000 un anticuerpo anti-GST de conejo (Chemicon, AB3282), que se podía unir a la GST (glutación S-transferasa) de Fc γ RIII asociado con el HM11200, el producto de HM11201 y los controles, en el tampón de ensayo, y se colocaron 100 μ l de la dilución en cada pocillo y se dejó que

reaccionara a 25 °C durante 2 horas con agitación a una tasa constante. Posteriormente, después de lavar seis veces con un tampón de lavado, se colocaron 100 µl de una dilución 1:7500 del anticuerpo contra el anticuerpo de conejo en el tampón de ensayo en cada pocillo.

- 5 Después de la reacción a 25 °C durante 2 horas con agitación a una tasa constante, se lavó seis veces la placa de 96 pocillos con un tampón de lavado. Se añadió un sustrato de la misma manera que en el ejemplo <5-3> y se midió la intensidad de color con un lector de ELISA. Como se observa en la FIG. 4, casi ninguna de las proteínas FcγRIII producidas en *E. coli* se unieron a FcγRI mientras que la IgG humana y Fc, ambos glucosilados, se asociaron fuertemente con FcγRIII.

<5-5> Ensayo de unión a FcRnαβ₂

- 10 Con la IgG sérica humana y el Fc separados por el tratamiento de IgG sérica humana sirviendo la papaína como controles, se diluyeron HM11200 y el producto de HM11201 purificado en el ejemplo <I-2> hasta una concentración de 20 µg/ml en el tampón carbonato respectivo (pH 9,0), seguido de la repetición de la dilución en serie 1:3 con el tampón carbonato siete veces. Se colocaron 100 µl de la dilución en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubó a 4 °C durante 18 horas de modo que se unieron en el fondo de la placa de 96 pocillos. Se lavó tres veces cada pocillo de la placa de 96 pocillos con 300 µl de un tampón de lavado que consistía en PBS (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,05 % (Amresco, n.º Cat. 0777). A continuación, se añadieron 300 µl de un tampón de ensayo que consistía en PBS (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,1 % y BSA al 0,5 % (Amresco, n.º Cat. 0332) a cada pocillo para evitar la unión no deseada de otras sustancias al fondo del pocillo, y se incubó a 37 °C durante 1 hora, seguido de la retirada completa de la solución de reacción. Se diluyó el FcRnαβ₂ purificado en el ejemplo <5-2> hasta una concentración de 3 µg/ml en la solución de ensayo. Se colocaron 100 µl de la dilución en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se dejó que reaccionara a 25 °C durante 2 horas con agitación a una tasa constante. Se lavaron los pocillos seis veces con el tampón de lavado. Se diluyó 1:10000 un anticuerpo anti-GST de conejo (Chemicon, AB3282), que se podía unir a la GST (glutación S-transferasa) de FcRnαβ₂ asociado con el HM11200, el producto de HM11201 y los controles, en el tampón de ensayo, y se colocaron 100 µl de la dilución en cada pocillo y se dejó que reaccionara a 25 °C durante 2 horas con agitación a una tasa constante. Posteriormente, después de lavar seis veces con un tampón de lavado, se colocaron 100 µl de una dilución 1:7500 de un anticuerpo contra el anticuerpo de conejo en el tampón de ensayo en cada pocillo.

- Después de la reacción a 25 °C durante 2 horas con agitación a una tasa constante, se lavó seis veces la placa de 96 pocillos con un tampón de lavado. Se añadió un sustrato de la misma manera que en el ejemplo <5-2> y se midió la intensidad de color con un lector de ELISA. Al igual que la IgG humana y el Fc glucosilado, como se observa en la FIG. 5, las proteínas Fc producidas en *E. coli* se unen fuertemente a FcRnαβ₂.

Ejemplo 6: Preparación y análisis farmacocinético del conjugado de EPO humana

<6-I> Preparación de EPO humana

- 35 Para preparar un conjugado de EPO humana (eritropoyetina), en primer lugar, se amplificó un gen de EPO por medio de RT-PCR usando ARN total aislado de células sanguíneas y se clonó en un vector pBluscript II (Stratagen), generando así un vector pBlueEP. Para transferir el gen de EPO clonado en un vector de expresión de célula animal pCMV/dhfr-(pCDNA3,1 (Invitrogen Company) que contenía un gen dhfr), se digirió el pBlueEP con HindIII y BamHI, y se insertó el fragmento que contenía el gen de EPO así obtenido en el vector de expresión de célula animal tratado con las mismas enzimas de restricción, proporcionando así el pcmvEP. Este vector de expresión que lleva el gen de EPO se transfirió en células CHO, una cepa de expresión de proteína, usando un reactivo Lipofectamine (Gibco). Se trataron las células con concentraciones gradualmente incrementadas de MTX hasta 120 nM para elevar los niveles de expresión de las mismas. Se expresó la EPO en niveles altos, mayores de 100 mg por litro.

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

- 45 Se mezcló ALD-PEG-ALD (Shearwater), un polietilenglicol de 3,4 kDa que tiene un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, con cantidades de tampón fosfato 100 mM que contenía la EPO preparada en <6-I> en una concentración de 5 mg/ml apropiada para formar un EPO: PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20. A esta mezcla, se le añadió un agente reductor, cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃, Sigma), a una concentración final de 20 mM y se dejó que reaccionaran a 4 °C durante 2 h agitación suave para dejar que el PEG se una de forma selectiva al extremo amino terminal de la EPO. Para obtener un complejo 1:1 de PEG y EPO, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex^R (Pharmacia). Se eluyó el complejo EPO-PEG de la columna usando tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, y se retiraron la EPO no unida a PEG, PEG sin reaccionar y subproductos dímeros donde PEG se unió a dos moléculas de EPO. Se concentró el complejo purificado EPO-PEG hasta 5 mg/ml. Por medio de este experimento, se descubrió que la proporción molar óptima para EPO con respecto a PEG, que proporciona la mayor reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5.

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

Se unió el complejo EPO-PEG preparado en el ejemplo <6-2> a una región Fc de inmunoglobulina producida usando el

HM11201 en el ejemplo <I-3>. En detalle, se disolvió el fragmento de región Fc de inmunoglobulina (aproximadamente 53 kDa) preparado en el ejemplo <I-3> en tampón fosfato 10 mM y se mezcló con el complejo EPO-PEG en una proporción molar de complejo EPO-PEG: región Fc de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de que se ajustara la concentración de tampón fosfato de la solución de reacción a 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se dejó que reaccionara a 4 °C durante 20 h con agitación suave. Por medio de este experimento, se descubrió que la proporción molar óptima para el complejo EPO-PEG con respecto al fragmento de región Fc, que proporciona la mayor reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2.

Después de la reacción de acoplamiento, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía líquida de alta presión para eliminar sustancias sin reaccionar y subproductos. Se desaló la solución de reacción de acoplamiento usando una columna de desalado HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón Tris 10 mM (pH 8,0). A continuación, la solución de reacción se cargó en 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) en un caudal de 8 ml/min, y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 M-0,2 M para obtener las fracciones deseadas. Se cargaron de nuevo las fracciones recogidas en una columna polyCAT 21,5x250 equilibrada con tampón acetato 10 mM (pH 5,2) en un caudal de 15 ml/min, y se eluyó esta columna con un gradiente lineal NaCl de 0,1-0,3 M, proporcionando así fracciones altamente puras.

<6-4> Análisis farmacocinético

La EPO natural preparada en el ejemplo <5-I>, Aranesp (Amgen) con un mayor contenido en ácido siálico para incrementar la semivida del mismo, y el conjugado EPO-PEG-Fc (grupo de prueba) preparado en el ejemplo <5-3> se inyectaron por vía subcutánea en una dosis de 100 µg/kg en cinco ratas SD por grupo. Después de la inyección subcutánea, se recogieron las muestras de sangre a 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 y 48 h en los grupos de control y a 1, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240, 288, 336 y 384 h en los grupos de prueba. Se recogieron las muestras de sangre en tubos de 1,5 ml, se coagularon y se centrifugaron durante 10 min usando un microcentrifugador de alta velocidad Eppendorf para retirar las células sanguíneas. Se midieron los niveles de proteína en suero por ELISA usando un anticuerpo específico para EPO.

La tabla 6, a continuación, y la FIG. 6 muestran semividas en suero de la proteína natural y el conjugado de proteínas. El conjugado de proteínas EPO-PEG-Fc (*E. coli*), preparado usando la región Fc de inmunoglobulina producida de acuerdo con la presente invención como vehículo, presentó una semivida en suero mucho mayor que la de la EPO natural. Se descubrió que la semivida extendida será mayor que la de Aranesp, conocido por ser una EPO de segunda generación EPO que tiene una semivida en suero larga.

Tabla 6

	EPO	Conjugado EPO-PEG-Fc	Aranesp
C _{max} ¹ (ng/ml)	30,4	192,8	96,8
T _{max} ² (h)	12,0	48,0	12,0
T _{1/2} ³ (h)	6,1	47,0	16,4
AUC ⁴ (ng.h/ml)	713	20436	4064
MKT ⁵ (h)	15,1	88	32
¹ Concentración máxima en suero ² Tiempo que tarda en alcanzar la concentración de fármaco máxima ³ Semivida en suero de un fármaco ⁴ Área bajo la curva de concentración en suero frente al tiempo ⁵ Media del tiempo que una molécula de fármaco reside en el cuerpo			

Aplicabilidad industrial

Como se ha descrito hasta ahora, el procedimiento de acuerdo con la presente invención permite una producción en masa de una región Fc de inmunoglobulina en una forma de cuerpo de inclusión en *E. coli* usando una región Fc de inmunoglobulina recombinante que comprende una región bisagra. Cuando se une a una proteína fisiológicamente activa, la región Fc de inmunoglobulina producida se puede usar eficazmente para potenciar la semivida en suero y la actividad fisiológica de la proteína fisiológicamente activa sin riesgo de inducir respuestas inmunitarias.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Hanmi	
	<120>	Un procedimiento para la producción en masa de una región Fc de inmunoglobulina con residuos de metionina iniciales eliminados	
5	<130>	HAN_P840EP	
	<140>	PCT/KR 06/003207	
	<141>	16/10/2006	
	<160>	75	
	<170>	PatentIn versión 3.3	
10	<210>	1	
	<211>	39	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
15	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG4	
	<400>	1	
		gggcatatgt catgccagc acctgagtc ctgggggga	39
	<210>	2	
	<211>	32	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador en 3' para amplificación de Fc de IgG4	
	<400>	2	
25		gggggatccc tattaccca gagacaggga ga	32
	<210>	3	
	<211>	39	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG4	
	<400>	3	
		gggcatatgc catcatgccc agcacctgag ttctgggg	39
	<210>	4	
35	<211>	40	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	

<220>

<223> cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG4

<400> 4

gggcatatgt gcccatcatg cccagcacct gagttcctgg 40

5 <210> 5

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG4

<400> 5

gggcatatgt gcccagcacc tgagttcctg ggggga 36

<210> 6

<211> 663

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(663)

20 <223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

Met-(fragmento de región bisagra de IgG4) fusionado a (región Fc de IgG4)

Met-(Ser-Cys-Pro)-IgG4 Fc

<400> 6

atgtcatgcc cagcaacctga gttcctgggg ggaccatcag tcttcctggt ccccccaaaa 60

cccaaggaca ctctcatgat ctcccggacc cctgagggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg 120

agccaggaag accccgaggt ccagttcaac tggtacgtgg atggcgtgga ggtgcataat 180

gccaaagaaa agccgcggga ggagcagttc aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 240

accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 300

ggcctcccggt cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagagcca 360

ES 2 456 672 T3

```

cagggtgtaca cccctgcccc atcccaggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 420
tgccctggtca aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 480
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact cgcacggctc cttcttcctc 540
tacagcaggc taacogtgga caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt ctcattgtcc 600
gtgatgcatg aggtcttga caaccactac acacagaaga gcctctccct gtctctgggt 660
aaa 663

```

<210> 7

<211> 221

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(221)

<223> proteína recombinante

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG4) fusionado a (región Fc de IgG4)

Met-(Ser-Cys-Pro)-IgG4 Fc

<220>

<221> SITIO

<222> (2)..(4)

15 <223> fragmento de región bisagra de IgG4 = SEQ ID NO: 18

<220>

<221> SITIO

<222> (5)..(221)

<223> Fc de IgG4

20 <400> 7

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 666

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(666)

10 <223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

ES 2 456 672 T3

Met-(fragmento de región bisagra de IgG4) fusionado a (región Fc de IgG4)

Met-(Pro-Ser-Cys-Pro)-IgG4Fc

```
<400> 8
atgccatcat gccagcacc tgagttcctg gggggaccat cagtcttctt gttcccccca 60
aaaccaagg acactctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgctt ggtgggtggac 120
gtgagccagg aagacccccg ggtccagttc aactggtaac tggatggcgt ggaggtgcat 180
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 240
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 300
aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagag 360
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 420
acctgectgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 480
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct 540
ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc 600
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg 660
ggtaaa 666
```

<210> 9

5 <211> 222

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

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

<223> proteína recombinante

Met-(fragmento de región bisagra de IgG4) fusionado a (región Fc de IgG4)

Met-(Pro-Ser-Cys-Pro)-IgG4 Fc

<220>

15 <221> SITIO

<222> (2).. (5)

<223> fragmento de región bisagra de IgG4 = SEQ ID NO:19

<220>

20 <221> SITIO

<222> (6)..(222)

<223> Fc de IgG4

<400> 9

ES 2 456 672 T3

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

<210> 10

<211> 669
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>

5 <221> misc_feature
<222> (1)..(669)
<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

Met-(fragmento de región bisagra de IgG4) fusionado a (región Fc de IgG4)

Met-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro-IgG4 Fc

```
<400> 10
atgtgcccacat catgcccagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc 60
ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggacccttg aggtcacgtg cgtggtggtg 120
gacgtgagcc aggaagaccc cgagggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggtg 180
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 240
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 300
aacaagggcc tcccgtcctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 360
gagccacagg tgtacacctt gcccctatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 420
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 480
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 540
ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca 600
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtct 660
ctgggtaaaa 669
```

10

<210> 11
<211> 223
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>

15 <221> mat_peptide
<222> (1)..(223)
<223> proteína recombinante

20 Met-(fragmento de región bisagra de IgG4) fusionado a (región Fc de IgG4)

Met-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro-IgG4 Fc

<220>

<221> SITIO
 <222> (2)..(6)
 <223> fragmento de región bisagra de IgG4 = SEQ ID NO:20
 <220>

5 <221> SITIO
 <222> (7)..(223)
 <223> Fc de IgG4
 <400> 11

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

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

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

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60

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

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

ES 2 456 672 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12

<211> 660

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(660)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG4) fusionado a (región Fc de IgG4)

Met-Cys-Pro-IgG4 Fc

<400> 12

atgtgcccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagttc tcctgttccc cccaaaaccc 60

aaggacactc tcatgatctc ccggaccctc gaggtcacgt gcgtgggtgt ggacgtgagc 120

caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc 180
aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 240
gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc 300
ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agagccacag 360
gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accagggtcag cctgacctgc 420
ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 480
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt ctctctctac 540
agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg caggagggga atgtcttctc atgctccgtg 600
atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa 660

<210> 13

<211> 220

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(220)

<223> proteína recombinante

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG4) fusionado a (región Fc de IgG4)

Met-Cys-Pro-IgG4 Fc

<220>

<221> SITIO

<222> (2)..(3)

15 <223> fragmento de región bisagra de IgG4 = SEQ ID NO: 21

<220>

<221> SITIO

<222> (4)..(220)

<223> Fc de IgG4

20 <400> 13

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

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

ES 2 456 672 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> DOMINIO

<222> (1)..(15)

<223> región bisagra de IgG1

<400> 14

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

5 <210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> DOMINIO

<222> (1)..(12)

<223> región bisagra de IgG2

<400> 15

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

15 <210> 16

<211> 62

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <221> DOMINIO

<222> (1)..(62)

<223> región bisagra de IgG3

<400> 16

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

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
50 55 60

25

<210> 17

	<211>	12
	<212>	PRT
	<213>	Homo sapiens
	<220>	
5	<221>	DOMINIO
	<222>	(1)..(12)
	<223>	IgG4 región bisagra
	<400>	17

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

10	<210>	18
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	Homo sapiens
	<220>	
15	<221>	PÉPTIDO
	<222>	(1)..(3)
	<223>	fragmento de región bisagra de IgG4
	<400>	18

	Ser	Cys	Pro
	1		

20	<210>	19
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	Homo sapiens
	<220>	
25	<221>	PÉPTIDO
	<222>	(1) .. (4)

	<223>	fragmento de región bisagra de IgG4	<400>	19
--	-------	-------------------------------------	-------	----

	Pro	Ser	Cys	Pro
	1			

30	<210>	20
	<211>	5
	<212>	PRT

<213> Homo sapiens
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(5)
 5 <223> fragmento de región bisagra de IgG4
 <400> 20

Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5

<210> 21
 <211> 2
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(2)
 15 <223> fragmento de región bisagra de IgG4
 <400> 21

Cys Pro
 1

<210> 22
 <211> 699
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(699)
 25 <223> proteína recombinante que codifica nucleótidos
 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1) Met-Glu-Pro-Lys-IgG1 Fc

```

<400> 22
atggagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 60
ctgggggggac cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 120
cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccg tgaggtcaag 180
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag 240
cagtacaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc gtcttcaccg tcctgcacca ggactggctg 300
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 360
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gagccacagg tgtacaccct gccccatcc 420
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 480
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 540
cctcccgctg tggaactcca cggtctcttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 600
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 660
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa 699

```

<210> 23

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(233)

<223> proteína recombinante

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Glu-Pro-Lys-IgG1 Fc

<220>

<221> SITIO

<222> (2).. (4)

15 <223> fragmento de región bisagra de IgG1 = SEQ ID NO: 48

<220>

<221> SITIO

<222> (5).. (233)

20 <223> Fc de IgG1

<400> 23

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

ES 2 456 672 T3

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 24

<211> 690

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(690)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Ser-Cys-Asp-IgG1 Fc

<400> 24

atgtcttgtg acaaaactca cacatgcccac ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 60

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc cgggaccctt 120

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 180

tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcggggagga gcagtacaac 240

agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 300

gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 360

aaagccaaaag ggcagccccc agagccacag gtgtacaccc tgcccccatc cggggatgag 420

ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 480

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 540

ctggaactccg acggtctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg 600

cagcagggga acgtcttctc atgtctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 660

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 690

<210> 25

15 <211> 230

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1).. (230)
 5 <223> proteína recombinante
 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)
 Met-Ser-Cys-Asp-IgG1 Fc
 <220>
 <221> SITIO
 10 <222> (2)..(4)
 <223> fragmento de región bisagra de IgG1 = SEQ ID NO:49
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (5)..(230)
 15 <223> Fc de IgG1
 <400> 25

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

ES 2 456 672 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 26

<211> 684

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(684)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Asp-Lys-Thr-IgG1 Fc

```

<400> 26
atggacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 60
gtcttctctt tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga ccttgaggtc 120
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcggtg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300
aagtgcgaag totccaacaa agccctccca gcccccacg agaaaaccat ctccaaagcc 360
aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagotgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta caccgagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa 684

```

<210> 27

<211> 228

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(228)

<223> proteína recombinante

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Asp-Lys-Thr-IgG1 Fc

<220>

<221> SITIO

<222> (2) .. (4)

15 <223> fragmento de región bisagra de IgG1 = SEQ ID NO:50

<220>

<221> SITIO

<222> (5)..(228)

<223> Fc de IgG1

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys 225

<210> 28

<211> 660

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (660)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Cys-Pro-IgG1 Fc

```

<400> 28
atgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc      60
aaggacaccc tcattgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc      120
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc      180
aagacaaagc cgcggggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc      240
gtcctgcacc aggactggct gaattggcaag gactacaagt gcaagggtct caacaaagcc      300
ctcccagccc ccattcgagaa aaccattctc aaagccaaag ggcagccccg agagccacag      360
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc      420
ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg      480
gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt ctctctctac      540
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg      600
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa      660

```

<210> 29

<211> 220

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

20 <222> (1)..(220)

<223> proteína recombinante

Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Cys-Pro-IgG1 Fc

<220>

<221> SITIO
 <222> (2)..(3)
 <223> fragmento de región bisagra de IgG1 = SEQ ID NO: 51
 <220>

5 <221> SITIO
 <222> (4)..(220)
 <223> Fc de IgG1
 <400> 29

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 30

<211> 696

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(696)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Pro-Lys-Ser-IgG1 Fc

<400> 30
atgcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 60
gggggaccgt cagtcttcct ctcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 120
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 360
 atctccaaag ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 420
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
 cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcacctg ggacaagagc 600
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 696

<210> 31

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(232)

<223> proteína recombinante

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Pro-Lys-Ser-IgG1 Fc

<220>

<221> SITIO

<222> (2)..(4)

15 <223> fragmento de región bisagra de IgG1 = SEQ ID NO:52

<220>

<221> SITIO

<222> (5)..(232)

<223> Fc de IgG1

20 <400> 31

Met Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

ES 2 456 672 T3

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

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

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 32

<211> 669

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(669)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

5 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Cys-Pro-Pro-IgG1 Fc

```

<400> 32
atgtgccac cgtgccacg acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 60
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg 120
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 180
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 240
gtcctcaccc tectgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc 300
aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 360
gagccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 420
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 480
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg tggactccga cggctccttc 540
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 600
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 660
ccgggtaaa 669

```

<210> 33

<211> 223

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(223)

15 <223> proteína recombinante

Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Cys-Pro-Pro-IgG1 Fc

<220>

<221> SITIO

20 <222> (2)..(4)

<223> fragmento de región bisagra de IgG1 = SEQ ID NO: 53

<220>

ES 2 456 672 T3

<221> SITIO

<222> (5)..(223)

<223> Fc de IgG1

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 663

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (663)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Pro-Pro-Cys-IgG1 Fc

<400> 34
atgccaccgt gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca 60
aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 120
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 180
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 240
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 300
aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagag 360
ccacaggtgt acaccctgcc cccacgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 420
tgccctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 480


```

ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 540
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcattgtcc 600
gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 660
aaa 663

```

<210> 35

<211> 222

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(222)

<223> proteína recombinante

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Pro-Pro-Cys-IgG1 Fc

<220>

<221> SITIO

<222> (2)..(4)

15 <223> fragmento de región bisagra de IgG1 = SEQ ID NO:54

<220>

<221> SITIO

<222> (5)..(222)

<223> Fc de IgG1

20 <400> 35

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 36

<211> 663

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(663)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Pro-Cys-Pro-IgG1 Fc

```

<400> 36
atgccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 60
cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 120
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 180
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 240
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 300
gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagagcca 360
caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 420
tgctgtgca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 480
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 540
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 600
gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 660
aaa 663

```

<210> 37

<211> 221

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(221)

<223> proteína recombinante

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG1) fusionado a (región Fc de IgG1)

Met-Pro-Cys-Pro-IgG1 Fc

<220>

<221> SITIO

<222> (2)..(4)

15 <223> fragmento de región bisagra de IgG1 = SEQ ID NO:55

<220>

<221> SITIO

<222> (5)..(221)

<223> IgG1 Fc

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 663

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(663)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG2) fusionado a (región Fc de IgG2)

Met-Pro-Pro-Cys-IgG2 Fc

```
<400> 38
atgccaccgt gccagcacc tccggtggcg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 60
cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 120
agccacgaag accctgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 180
gccaaagaaa agccgcggga ggagcagttt aacagcacgt ttcgtgtggt cagcgtcctc 240
accgtcgtgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 300
ggcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagagcca 360
caggtgtaca ccctgcccc atcccggaag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 420
tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 480
ccggagaaca actacaagac cagcctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc 540
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcattgctc 600
gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 660
aaa 663
```

<210> 39

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> mat_peptide

<222> (1)..(221)

<223> proteína recombinante

Met-(fragmento de región bisagra de IgG2) fusionado a (región Fc de IgG2)

Met-Pro-Pro-Cys-IgG2 Fc

5 <220>

<221> SITIO

<222> (2).. (4)

<223> fragmento de región bisagra de IgG2 = SEQ ID NO: 56

<220>

10 <221> SITIO

<222> (5)..(221)

<223> Fc de IgG2

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

15

ES 2 456 672 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 40

<211> 660

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(660)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG2) fusionado a (región Fc de IgG2)

Met-Pro-Cys-Pro-IgG2 Fc

<400> 40
atgccgtgcc cagcacctcc ggtggcgagg cgcgcagtct tctcttccc cccaaaaccc 60
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 120
cacgaagacc ctgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 180
aagacaaagc cgcggggagga gcagtttaac agcacgtttc gtgtgggtcag cgtctcacc 240

```

gtcgtgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc   300
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag ggcagccccg agagccacag   360
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaagag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc   420
ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg   480
gagaacaact acaagaccac gcctcccatg ctggactccg acggctcctt cttcctctac   540
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg   600
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa   660

```

<210> 41

<211> 220

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(220)

<223> proteína recombinante

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG2) fusionado a (región Fc de IgG2)

Met-Pro-Cys-Pro-IgG2 Fc

<220>

<221> SITIO

<222> (2)..(4)

15 <223> fragmento de región bisagra de IgG2 = SEQ ID NO: 57

<220>

<221> SITIO

<222> (5)..(220)

<223> Fc de IgG2

20 <400> 41

```

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

```

```

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

```

```

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

```


ES 2 456 672 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 657

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(657)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

Met-(fragmento de región bisagra de IgG2) fusionado a (región Fc de IgG2)

Met-Cys-Pro-IgG2 Fc

```

<400> 42
atgtgccag cactccggt ggcgggaccg tcagtcttcc ttttcccccc aaaacccaag    60
gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tggtaggtgga cgtgagccac    120
gaagaccctg aggtccagtt caactggtag gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag    180
acaaagccgc gggaggagca gttaacagc acgtttcgtg tggtcagcgt cctcaccgtc    240
gtgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc    300
ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa accaaagggc agccccgaga gccacagggtg    360
tacaccctgc ccccatcccg ggaagagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg    420
gtcaaaggct tctatcccg cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag    480
aacaactaca agaccacgcc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc    540
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg    600
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtctcc gggtaaa    657

```

5 <210> 43
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

10 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(219)
 <223> proteína recombinante
 Met-(fragmento de región bisagra de IgG2) fusionado a (región Fc de IgG2)
 Met-Cys-Pro-IgG2 Fc

15 <220>
 <221> SITIO
 <222> (2)..(3)
 <223> fragmento de región bisagra de IgG2 = SEQ ID NO: 58

20 <220>
 <221> SITIO
 <222> (4)..(219)
 <223> Fc de IgG2

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 44

<211> 678
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>

5 <221> rmisc_feature
 <222> (1)..(678)
 <223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

Met-(fragmento de región bisagra de IgG2) fusionado a (región Fc de IgG2)

Met-Cys-Cys-Val-Glu-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-IgG2 Fc

```

<400> 44
atgtgtgtgtg tcgagtgtccc accgtgtccca gcacctccgg tggcgggacc gtcagtcttc      60
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc      120
gtggtgtgtg acgtgagcca cgaagacct gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      180
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtttaacag cacgtttcgt      240
gtggtcagcg tcctcaccgt cgtgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc      300
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg      360
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaagagat gaccaagaac      420
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg      480
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccatgct ggactccgac      540
ggctecttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac      600
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      660
tcctgtctc cgggtaaa
    
```

10

<210> 45
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>

<221> mat_peptide
 <222> (1)..(226)
 <223> proteína recombinante

Met-(fragmento de región bisagra de IgG2) fusionado a (región Fc de IgG2)

20 Met-Cys-Cys-Val-Glu-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-IgG2 Fc

<220>
 <221> SITIO
 <222> (2)..(10)

<223> fragmento de región bisagra de IgG2 = SEQ ID NO: 59

<220>

<221> SITIO

<222> (11)..(226)

5 <223> Fc de IgG2

<400> 45

Met Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 456 672 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
225

<210> 46

<211> 675

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(675)

<223> proteína recombinante que codifica nucleótidos

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG2) fusionado a (región Fc de IgG2)

Met-Cys-Val-Glu-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-IgG2 Fc

<400> 46

```

atgtgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca cctccggtgg cgggaccgtc agtcttcctc    60
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg    120
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg    180
gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt ttaacagcac gtttcgtgtg    240
gtcagcgtcc tcaccgtcgt gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag    300
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag    360
ccccgagagc cacaggtgta caccctgccg ccatcccgga aagagatgac caagaaccag    420
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag    480
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccatgctgga ctccgacggc    540
tcctttcttc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc    600
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccaact acacgcagaa gagcctctcc    660
ctgtctccgg gtaaa                                                    675

```

<210> 47

<211> 225

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(225)

<223> proteína recombinante

10 Met-(fragmento de región bisagra de IgG2) fusionado a (región Fc de IgG2)

Met-Cys-Val-Glu-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-IgG2 Fc

<220>

<221> SITIO

<222> (2)..(9)

15 <223> fragmento de región bisagra de IgG2 = SEQ ID NO: 60

<220>

<221> SITIO

<222> (10)..(225)

<223> Fc de IgG2

20 <400> 47

ES 2 456 672 T3

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

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

Lys
225

<210> 48

<211> 3

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1) .. (3)

<223> fragmento de región bisagra de IgG1

10 <400> 48

Glu Pro Lys
1

<210> 49

<211> 3

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(3)

<223> fragmento de región bisagra de IgG1

20 <400> 49

Ser Cys Asp
1

<210> 50

<211> 3

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(3)

<223> fragmento de región bisagra de IgG1

<400> 50

Asp Lys Thr
1

<210> 51

<211> 2

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(2)

<223> fragmento de región bisagra de IgG1

10 <400> 51

Cys Pro
1

<210> 52

<211> 3

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(3)

<223> fragmento de región bisagra de IgG1

20 <400> 52

Pro Lys Ser
1

<210> 53

<211> 3

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(3)

<223> fragmento de región bisagra de IgG1

30

<400> 53

Cys Pro Pro
1

<210> 54

<211> 3

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1).. (3)

10 <223> fragmento de región bisagra de IgG1

<400> 54

Pro Pro Cys
1

<210> 55

<211> 3

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(3)

20 <223> fragmento de región bisagra de IgG1

<400> 55

Pro Cys Pro
1

<210> 56

<211> 3

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(3)

30 <223> fragmento de región bisagra de IgG2

<400> 56

Pro Pro Cys
1

<210> 57
<211> 3
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(3)
10 <223> fragmento de región bisagra de IgG2
<400> 57

Pro Cys Pro
1

<210> 58
<21L> 2
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1) .. (2)
20 <223> fragmento de región bisagra de IgG2
<400> 58

Cys Pro
1

<210> 59
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)
30 <223> fragmento de región bisagra de IgG2
<400> 59

	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
	1				5				
	<210>		60						
	<211>		8						
5	<212>		PRT						
	<213>		Homo sapiens						
	<220>								
	<221>		PÉPTIDO						
	<222>		(1)..(8)						
10	<223>		fragmento de región bisagra de IgG2						
	<400>		60						
	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
	1				5				
	<210>		61						
	<211>		40						
15	<212>		ADN						
	<213>		Secuencia artificial						
	<220>								
	<223>		cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG1						
	<400>		61						
20	ggaattccat atggagccca aatctgtga caaaactcac								40
	<210>		62						
	<211>		39						
	<212>		ADN						
	<213>		Secuencia artificial						
25	<220>								
	<223>		cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG1						
	<400>		62						
	ggaattccat atgtctgtg acaaaactca cacatgccc								39
	<210>		63						
30	<211>		40						
	<212>		ADN						
	<213>		Secuencia artificial						
	<220>								

	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG1	
	<400>	63	
		ggaattccat atggacaaaa ctacacatg cccaccgtgc	40
5	<210>	64	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
10	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG1	
	<400>	64	
		gggaattcca tatgtgccca gcacctgaac tcttgggg	38
	<210>	65	
	<211>	38	
15	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG1	
	<400>	65	
20		gggaattcca tatgccc aaa tctgtgaca aaactcac	38
	<210>	66	
	<211>	42	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG1	
	<400>	66	
		gggaattcca tatgtgccca ccgtgccag cacctgaact cc	42
	<210>	67	
30	<211>	40	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG1	
35	<400>	67	
		ggaattccat atgccaccgt gccagcacc tgaactctg	40

	<210>	68	
	<211>	40	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG1	
	<400>	68	
		ggaattccat atgccgtgcc cagcacctga actcctgggg	40
10	<210>	69	
	<211>	40	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
15	<223>	cebador en 3' para amplificación de Fc de IgG1	
	<400>	69	
		cgcggtatcct catttaccg gagacaggga gaggctcttc	40
	<210>	70	
	<211>	43	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG2	
	<400>	70	
25		gggaattcca tatgccaccg tgcccagcac cacctgtggc agg	43
	<210>	71	
	<211>	42	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG2	
	<400>	71	
		gggaattcca tatgccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg ac	42
	<210>	72	
35	<211>	39	
	<212>	ADN	

	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG2	
5	<400>	72	
		gggaattcca tatgtgccca gcaccacctg tggcaggac	39
	<210>	73	
	<211>	43	
	<212>	ADN	
10	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG2	
	<400>	73	
		gggaattcca tatgtgttgt gtcgagtgcc caccgtgccc agc	43
15	<210>	74	
	<211>	43	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
20	<223>	cebador en 5' para amplificación de Fc de IgG2	
	<400>	74	
		gggaattcca tatgtgtgtc gagggtccac cgtgcccagc acc	43
	<210>	75	
	<211>	40	
25	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador en 3' para amplificación de Fc de IgG2	
	<400>	75	
30		cgcggtatcct catttaccg gagacaggga gaggctcttc	40

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una región Fc de inmunoglobulina libre de un residuo de metionina codificada por un codón de iniciación en una escala en masa, que comprende:

5 preparar un vector de expresión recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc de inmunoglobulina recombinante compuesta de una región Fc de inmunoglobulina unida a un extremo N terminal de la misma a una región bisagra de la inmunoglobulina por medio de un enlace peptídico;

transformar un *E. coli* con el vector de expresión recombinante para crear un transformante;

cultivar el transformante para expresar la región Fc de inmunoglobulina como un cuerpo de inclusión;

aislar y purificar la región Fc de inmunoglobulina del cuerpo de inclusión; y

10 solubilizar y replegar el fragmento Fc de inmunoglobulina,

en el que dicha región bisagra de inmunoglobulina tiene cisteína, serina o prolina como aminoácido inicial del extremo N terminal.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región Fc de inmunoglobulina está aislada en una forma monomérica o dimerica.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región bisagra tiene dos o más secuencias de aminoácidos consecutivas derivadas de la región bisagra de IgG, IgA, IgM, IgE, o IgD.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la región bisagra tiene dos o más secuencias de aminoácidos consecutivas, incluyendo cada una al menos un residuo de cisteína.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la IgG está seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la región bisagra tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 18, 19, 20, 21, 49, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región Fc de inmunoglobulina está seleccionada del grupo que consiste en regiones Fc de IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, y combinaciones e híbridos de las mismas.
- 25 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la región Fc de inmunoglobulina es la región Fc de la IgG seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y combinaciones e híbridos de las mismas.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región Fc de inmunoglobulina está compuesta de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en los dominios C_H2, C_H3 y C_H4.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región Fc de inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 7, 9, 11, 13, 25, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47.
- 30 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 7, 9, 11, 13, 25, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el transformante se transforma por un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 7, 9, 11, 13, 25, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47.
- 35 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el transformante está seleccionado del grupo que consiste en los números de acceso KCCM-10659P, KCCM-10660P, KCCM-10665P y KCCM-10666P.

FIG. 1

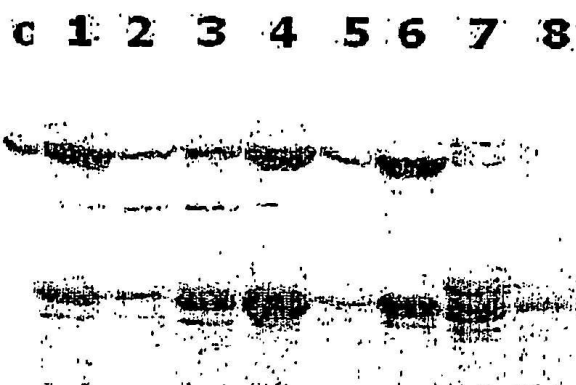


FIG. 2

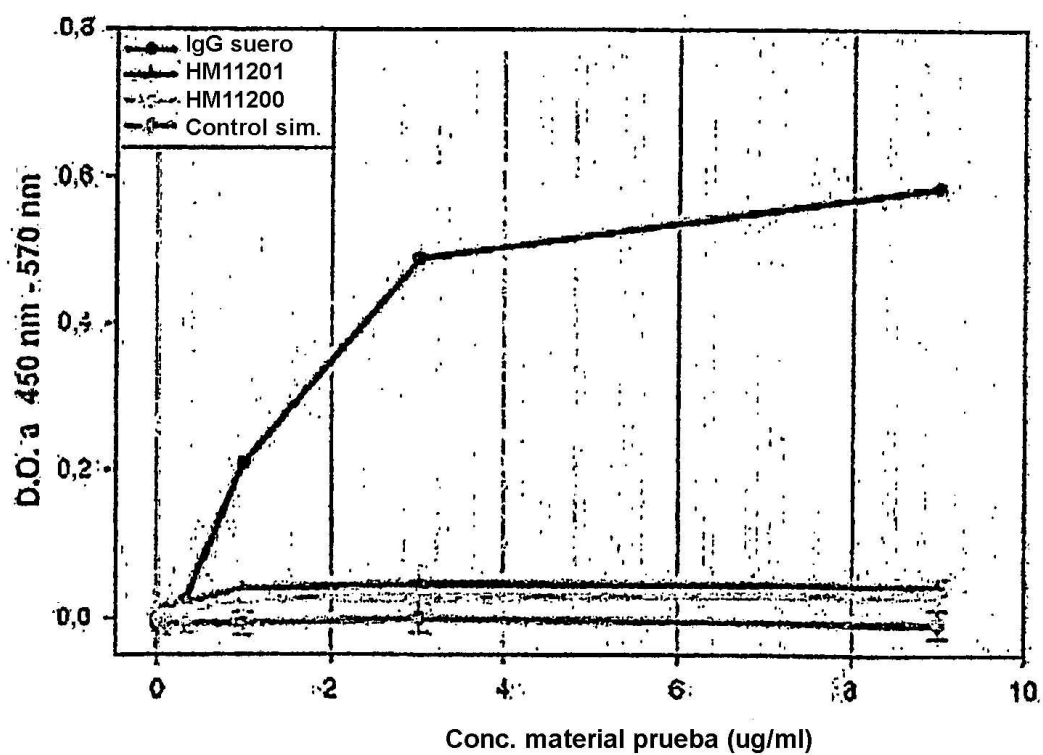


FIG. 3

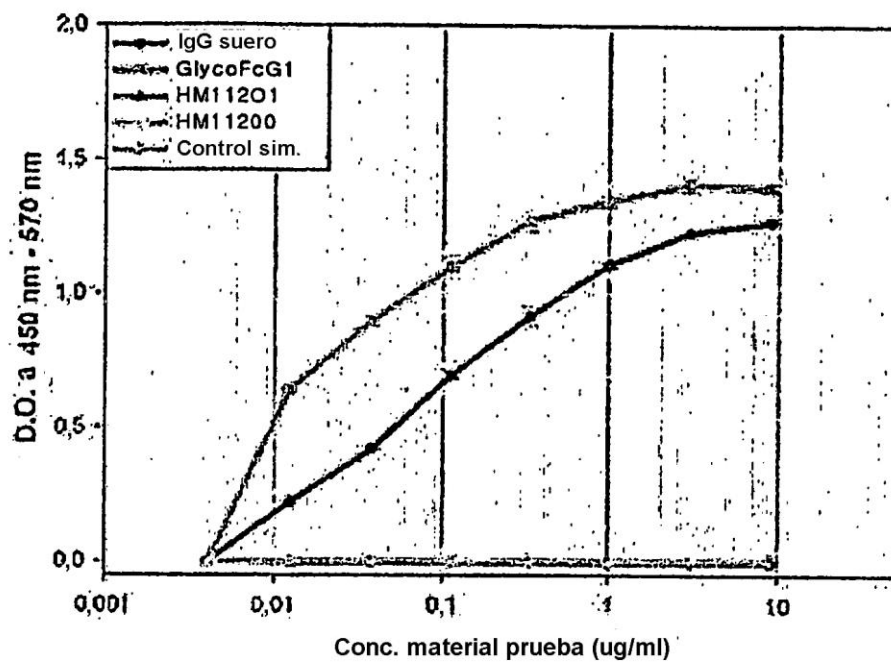


FIG. 4

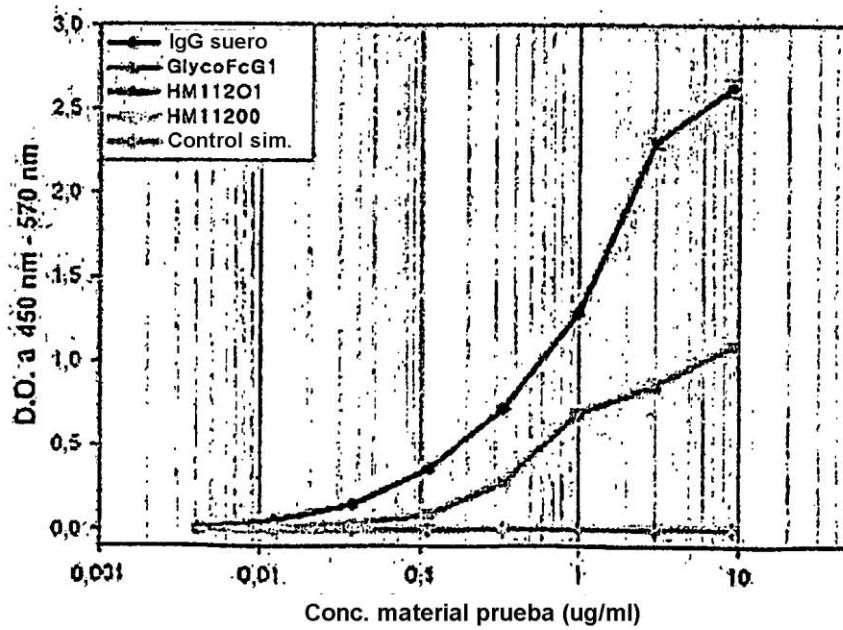


FIG. 5

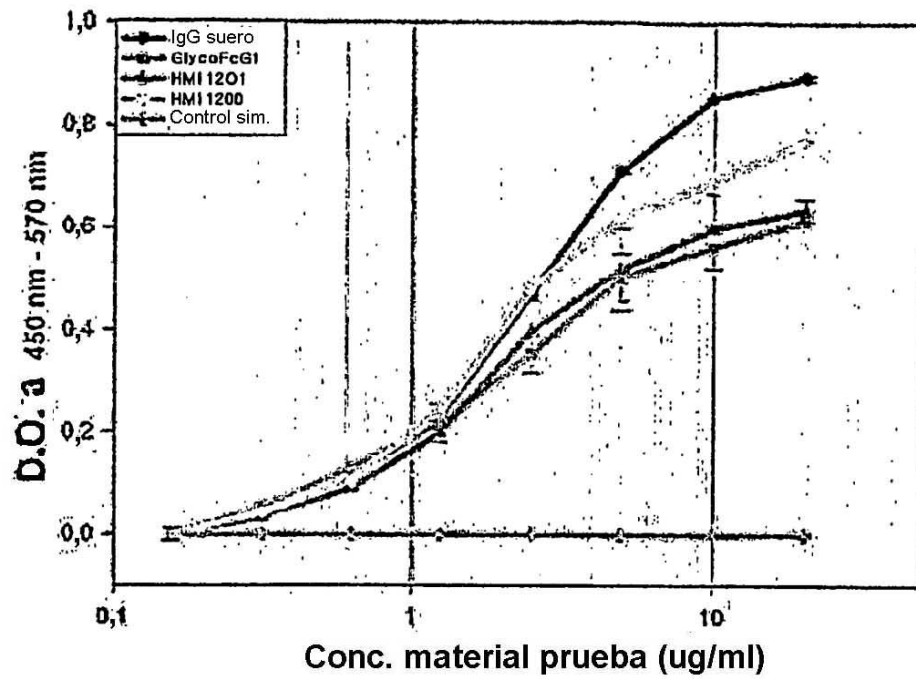


FIG. 6

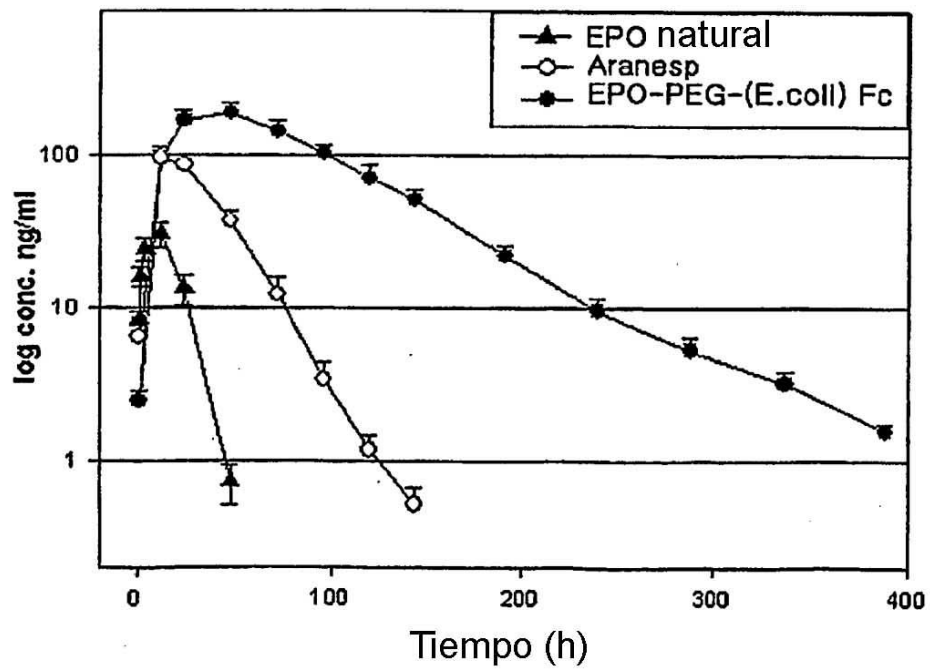


FIG. 7

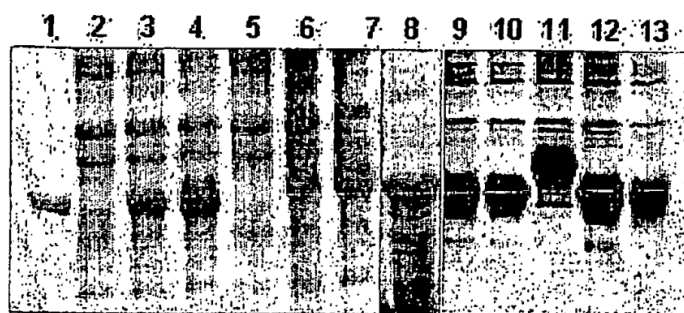


FIG. 8

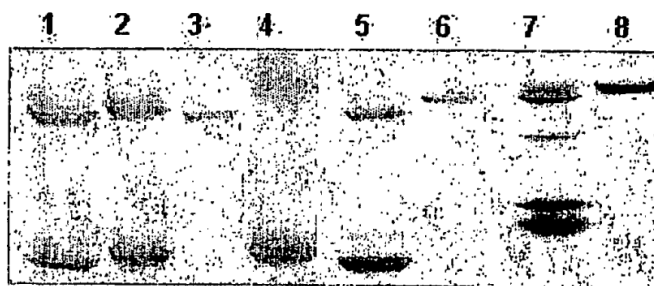


FIG. 9

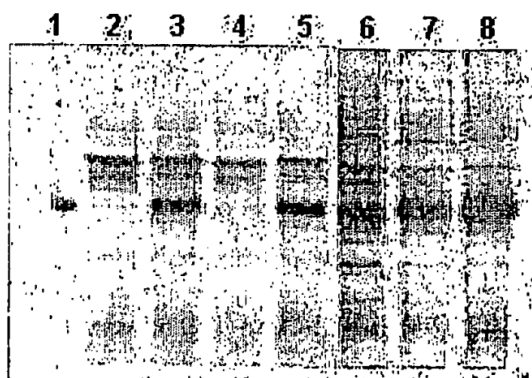


FIG. 10

