

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 947**

51 Int. Cl.:

C07K 14/505 (2006.01)

C07K 14/555 (2006.01)

C07K 14/56 (2006.01)

C07K 14/565 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2004 E 10182890 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2361932**

54 Título: **Híbridos de monómero-dímero quiméricos de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

06.05.2003 US 469600 P

17.07.2003 US 487964 P

26.01.2004 US 539207 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2016

73 Titular/es:

BIOGEN HEMOPHILIA INC. (100.0%)

250 Binney Street

Cambridge MA 02142, US

72 Inventor/es:

PETERS, ROBERT T.;

MEZO, ADAM R.;

RIVERA, DANIEL S.;

BITONTI, ALAN J.;

STATTEL, JAMES M y

LOW, SUSAN C

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 582 947 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

Híbridos de monómero-dímero quiméricos de inmunoglobulina

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere generalmente a proteínas quiméricas terapéuticas que comprenden dos cadenas de polipéptidos, en las que la primera cadena comprende una molécula biológicamente activa terapéutica y la segunda cadena no comprende la molécula biológicamente activa terapéutica de la primera cadena. Más específicamente, la presente descripción se refiere a proteínas quiméricas que comprenden dos cadenas de polipéptidos, en las que ambas cadenas comprenden al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina en la que la primera cadena se modifica para comprender además una molécula biológicamente activa, y la segunda cadena no se modifica así. Así, la presente descripción se refiere a una proteína quimérica que es un híbrido de monómero-dímero, es decir, una proteína quimérica que tiene un aspecto dímérico y un aspecto monomérico, refiriéndose el aspecto dímérico al hecho de que comprende dos cadenas de polipéptidos que comprende cada una una parte de una región constante de inmunoglobulina, y refiriéndose el aspecto monomérico al hecho de que solo una de las dos cadenas comprende una molécula biológicamente activa terapéutica. La Figura 10 1 ilustra un ejemplo de un híbrido de monómero-dímero en el que la molécula biológicamente activa es eritropoyetina (EPO) y la parte de una región constante de inmunoglobulina es una región Fc de IgG.

Antecedentes de la invención

15 Las inmunoglobulinas comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, que se asocian mediante enlaces disulfuro para formar tetrámeros. Cada cadena comprende además una región variable y una región constante. Las regiones variables median en el reconocimiento de antígeno y la unión, mientras que las regiones constantes, particularmente las regiones constantes de la cadena pesada, median en una variedad de funciones efectoras, por ejemplo, unión a complemento y unión a receptor de Fc (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU.: 6.086.875; 5.624.821; 5.116.964).

20 La región constante comprende adicionalmente dominios denominados dominios CH (pesados constantes) (CH1, CH2, etc.). Dependiendo del isotipo (es decir, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), la región constante puede estar comprendida de tres o cuatro dominios CH. Algunas regiones constantes de isotipos (por ejemplo, IgG) también contienen una región bisagra, Janeway y col. 2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y., N.Y.

25 Se ha descrito la creación de proteínas quiméricas que comprenden regiones constantes de inmunoglobulina ligadas a una proteína de interés, o fragmento de la misma (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.480.981 y 5.808.029; Gascoigne y col. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936; Capon y col. 1989, Nature 337:525; Traunecker y col. 1989, Nature 339:68; Zettmeissi y col. 1990, DNA Cell Biol. USA 9:347; Bym y col. 1990, Nature 344:667; Watson y col. 1990, J. Cell. Biol. 110:2221; Watson y col. 1991, Nature 349:164; Aruffo y col. 1990, Cell 61:1303; Linsley y col. 1991, J. Exp. Med. 173:721; Linsley y col. 1991, J. Exp. Med. 174:561; Stamenkovic y col., 1991, Cell 66:1133; Ashkenazi y col. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535; Lesslauer y col. 1991, Eur. J. Immunol. 27:2883; Peppel y col. 1991, J. Exp. Med. 174:1483; Bennett y col. 1991, J. Biol. Chem. 266:23060; Kurschner y col. 1992, J. Biol. Chem. 267:9354; Chalupny y col. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10360; Ridgway y Gorman, 1991, J. Cell. Biol. 115, Resumen nº 1448; Zheng y col. 1995, J. Immun. 154:5590). Estas moléculas normalmente poseen tanto la actividad biológica asociada a la molécula ligada de interés, como además la función efectora, o alguna otra característica deseada asociada a la región constante de inmunoglobulina (por ejemplo, estabilidad biológica, secreción celular).

30 La parte Fc de una región constante de inmunoglobulina, dependiendo del isotipo de la inmunoglobulina, puede incluir los dominios CH2, CH3 y CH4, además de la región bisagra. Proteínas quiméricas que comprenden una parte Fc de una inmunoglobulina confieren varias propiedades deseables a una proteína quimérica que incluyen elevada estabilidad, elevada semivida en suero (véase Capon y col. 1989, Nature 337:525), además de unión a receptores de Fc tales como el receptor de Fc neonatal (FcRn) (patentes de EE.UU. 6.086.875, 6.485.726, 6.030.613; documentos WO 03/077834; US2003-0235536A1).

35 El FcRn es activo en tejido epitelial adulto y se expresa en la luz de los intestinos, vías respiratorias pulmonares, superficies nasales, superficies vaginales, superficies del colon y rectales (patente de EE.UU. 6.485.726). Las proteínas quiméricas que comprenden componentes de unión a FcRn (por ejemplo, IgG, fragmentos Fc) pueden transportarse eficazmente a través de barreras epiteliales por FcRn, proporcionando así un medio no invasivo para administrar sistémicamente una molécula terapéutica deseada. Adicionalmente, las proteínas quiméricas que comprenden un componente de unión a FcRn son endocitadas por células que expresan el FcRn. Pero en lugar de marcarse para la degradación, estas proteínas quiméricas se reciclan de nuevo a la circulación, aumentando así la semivida *in vivo* de estas proteínas.

40 Las partes de regiones constantes de inmunoglobulina, por ejemplo, componentes de unión a FcRn, normalmente se asocian entre sí mediante enlaces disulfuro y otras interacciones no específicas para formar dímeros y multímeros de mayor orden. La presente descripción, que incluye la presente invención, se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que la transición de proteínas quiméricas que comprenden componentes de unión a FcRn

parece estar limitada por el peso molecular de la proteína quimérica, siendo especies de mayor peso molecular transportadas al menos eficientemente.

Las proteínas quiméricas que comprenden moléculas biológicamente activas, una vez administradas, normalmente interaccionarán con una molécula diana o célula. La presente descripción, que incluye la presente invención, se basa adicionalmente en parte en el sorprendente descubrimiento de que los híbridos de monómero-dímero, con una molécula biológicamente activa, pero dos partes de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, dos componentes de unión a FcRn, funcionan y puede transportarse más eficazmente que los homodímeros, también denominados en la presente memoria simplemente "dímeros" o multímeros de mayor orden con dos o más copias de la molécula biológicamente activa. Esto es debido en parte al hecho de que puede impedirse estéricamente que las proteínas quiméricas, que comprenden dos o más moléculas biológicamente activas, que existen como dímeros y multímeros de mayor orden, interaccionen con su molécula diana o célula, debido a la presencia de las dos o más moléculas biológicamente activas en estrecha proximidad entre sí y que la molécula biológicamente activa puede tener una alta afinidad por sí misma.

Por consiguiente, un aspecto de la presente descripción proporciona proteínas quiméricas que comprenden una molécula biológicamente activa que es transportada a través de la barrera del epitelio. Un aspecto adicional de la presente descripción proporciona proteínas quiméricas que comprenden al menos una molécula biológicamente activa que puede interaccionar con su molécula diana o célula con poco o ningún impedimento estérico o autoagregación.

Los aspectos de la presente descripción proporcionan proteínas quiméricas que comprenden una primera y segunda cadena de polipéptidos, comprendiendo la primera cadena al menos una parte de la región constante de inmunoglobulina, en la que la parte de una región constante de inmunoglobulina se ha modificado para incluir una molécula biológicamente activa, y comprendiendo la segunda cadena al menos una parte de región constante de inmunoglobulina, en la que la parte de una región constante de inmunoglobulina no se ha modificado así para incluir la molécula biológicamente activa de la primera cadena.

Compendio de la presente descripción

La presente descripción se refiere a una proteína quimérica que comprende una molécula biológicamente activa y dos moléculas de al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina. La proteína quimérica puede interaccionar con una molécula diana o célula con menos impedimento estérico en comparación con una proteína quimérica que comprende al menos dos moléculas biológicamente activas y al menos una parte de dos regiones constantes de inmunoglobulina. La presente descripción también se refiere a una proteína quimérica que comprende al menos una molécula biológicamente activa y dos moléculas de al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina que es transportada a través de una barrera de epitelio más eficientemente que un homodímero correspondiente, es decir, en la que ambas cadenas están ligadas a la misma molécula biológicamente activa. Así, la presente descripción se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos ligadas juntas, en la que dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, pero no la región variable de inmunoglobulina y sin ninguna molécula biológicamente activa unida.

La presente descripción se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos ligadas juntas, en la que dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin una región variable de inmunoglobulina o cualquier molécula biológicamente activa y en la que dicha segunda cadena no está covalentemente unida a ninguna molécula que tenga un peso molecular superior a 1 kD, 2 kD, 5 kD, 10 kD o 20 kD. En un caso, la segunda cadena no está covalentemente unida a ninguna molécula que tenga un peso molecular superior a 0-2 kD. En un caso, la segunda cadena no está covalentemente unida a ninguna molécula que tenga un peso molecular superior a 5-10 kD. En un caso, la segunda cadena no está covalentemente unida a ninguna molécula que tenga un peso molecular superior a 15-20 kD.

La presente descripción se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos ligadas juntas, en la que dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina no covalentemente ligada a ninguna otra molécula, excepto la parte de una inmunoglobulina de dicha primera cadena de polipéptidos.

La presente descripción se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos ligadas juntas, en la que dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena consiste en al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y opcionalmente una marca de afinidad.

La presente descripción se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera y una segunda cadena de

polipéptidos ligadas juntas, en la que dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena consiste esencialmente en al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y opcionalmente una marca de afinidad.

5 La presente descripción se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos ligadas juntas, en la que dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin una región variable de inmunoglobulina o cualquier molécula biológicamente activa y opcionalmente una molécula con un peso molecular inferior a 10 kD, 5 kD, 2 kD o 1 kD. En un caso, la segunda cadena comprende una molécula inferior a 15-20 kD. En un caso, la segunda cadena comprende una molécula inferior a 5-10 kD. En un caso, la segunda cadena comprende una molécula inferior a 1-2 kD.

15 La presente descripción se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en la que dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y al menos un primer dominio, teniendo dicho primer dominio al menos un componente de unión específico, y en la que dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y al menos un segundo dominio, en la que dicho segundo dominio es un componente de unión específico de dicho primer dominio, sin ninguna región variable de inmunoglobulina o una molécula biológicamente activa.

20 La presente descripción se refiere a un procedimiento de preparación de una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en la que la primera cadena de polipéptidos y la segunda cadena de polipéptidos no son las mismas, comprendiendo dicho procedimiento transfectar una célula con una primera construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica una primera cadena de polipéptidos que comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y opcionalmente un ligante, y una segunda construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica una segunda cadena de polipéptidos que comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin ninguna molécula biológicamente activa, o una región variable de inmunoglobulina, y opcionalmente un ligante, cultivar las células en condiciones tales que se exprese la cadena de polipéptidos codificada por la primera construcción de ADN y se exprese la cadena de polipéptidos codificada por la segunda construcción de ADN, y aislar híbridos de monómero-dímero que comprenden la cadena de polipéptidos codificada por la primera construcción de ADN y la cadena de polipéptidos codificada por la segunda construcción de ADN.

25 La presente descripción se refiere a un procedimiento de preparación de una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en la que la primera cadena de polipéptidos y la segunda cadena de polipéptidos no son las mismas, y en la que dicha primera cadena de polipéptidos comprende una molécula biológicamente activa, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y al menos un primer dominio, teniendo dicho primer dominio al menos un componente de unión específico, y en la que dicha segunda cadena de polipéptidos comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y un segundo dominio, en la que dicho segundo dominio es un componente de unión específico de dicho primer dominio, sin ninguna molécula biológicamente activa o una región variable de inmunoglobulina, comprendiendo dicho procedimiento transfectar una célula con una primera construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica dicha primera cadena de polipéptidos y una segunda construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica dicha segunda cadena de polipéptidos, cultivar las células en condiciones tales que se exprese la cadena de polipéptidos codificada por la primera construcción de ADN y se expresa la cadena de polipéptidos codificada por la segunda construcción de ADN y aislar híbridos de monómero-dímero que comprenden la cadena de polipéptidos codificada por la primera construcción de ADN y cadena de polipéptidos codificada por la segunda construcción de ADN.

35 La presente descripción se refiere a un procedimiento de preparación de una proteína quimérica de la presente descripción, comprendiendo dicho procedimiento transfectar una célula con una primera construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica una primera cadena de polipéptidos que comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y opcionalmente un ligante, cultivar la célula en condiciones tales que se exprese la cadena de polipéptidos codificada por la primera construcción de ADN, aislar la cadena de polipéptidos codificada por la primera construcción de ADN y transfectar una célula con una segunda construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica una segunda cadena de polipéptidos que comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin ninguna molécula biológicamente activa o región variable de inmunoglobulina, cultivar la célula en condiciones tales que se exprese la cadena de polipéptidos codificada por la segunda construcción de ADN, aislar la cadena de polipéptidos codificada por la segunda construcción de ADN, combinar la cadena de polipéptidos codificada por la primera construcción de ADN y la cadena de polipéptidos codificada por la segunda construcción de ADN en condiciones tales que se formen híbridos de monómero-dímero que comprenden la cadena de polipéptidos codificada por la primera construcción de ADN y la cadena de polipéptidos codificada por la segunda construcción de ADN, y aislar dichos híbridos de monómero-dímero.

60 La presente descripción se refiere a un procedimiento de preparación de una proteína quimérica que comprende una

primera y segunda cadena de polipéptidos, en la que la primera cadena de polipéptidos y la segunda cadena de polipéptidos no son las mismas, comprendiendo dicho procedimiento transfectar una célula con una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica una cadena de polipéptidos que comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, cultivar las células en condiciones tales que la cadena de polipéptidos codificada por la construcción de ADN se exprese con una cisteína del extremo N de manera que se formen dímeros de la cadena de polipéptidos y aislar dímeros que comprenden dos copias de la cadena de polipéptidos codificada por la construcción de ADN y hacer reaccionar químicamente los dímeros aislados con una molécula biológicamente activa, en la que dicha molécula biológicamente activa tiene un tioéster en el extremo C, en condiciones tales que la molécula biológicamente activa reaccione predominantemente con solo una cadena de polipéptidos del dímero formando así un híbrido de monómero-dímero.

La presente descripción se refiere a un procedimiento de preparación de una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en la que la primera cadena de polipéptidos y la segunda cadena de polipéptidos no son las mismas, comprendiendo dicho procedimiento transfectar una célula con una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica una cadena de polipéptidos que comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, cultivar las células en condiciones tales que la cadena de polipéptidos codificada por la construcción de ADN se expresa con una cisteína del extremo N de manera que se formen dímeros de las cadenas de polipéptidos, y aislar dímeros que comprenden dos copias de la cadena de polipéptidos codificada por la construcción de ADN, y hacer reaccionar químicamente los dímeros aislados con una molécula biológicamente activa, en la que dicha molécula biológicamente activa tiene un tioéster en el extremo C, de forma que la molécula biológicamente activa esté ligada a cada cadena del dímero, desnaturalizar el dímero que comprende la parte de la inmunoglobulina ligada a la molécula biológicamente activa de manera que se formen cadenas monoméricas, combinar las cadenas monoméricas con una cadena de polipéptidos que comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin una molécula biológicamente activa ligada a la misma, de manera que se formen híbridos de monómero-dímero, y aislar los híbridos de monómero-dímero.

La presente descripción se refiere a un procedimiento de preparación de una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en la que la primera cadena de polipéptidos y la segunda cadena de polipéptidos no son las mismas, comprendiendo dicho procedimiento transfectar una célula con una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica una cadena de polipéptidos que comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, cultivar las células en condiciones tales que la cadena de polipéptidos codificada por la construcción de ADN se exprese como una mezcla de dos cadenas de polipéptidos, en la que la mezcla comprende un polipéptido con una cisteína en el extremo N, y un polipéptido con una cisteína en estrecha proximidad al extremo N, aislar dímeros que comprenden la mezcla de cadenas de polipéptidos codificados por la construcción de ADN y hacer reaccionar químicamente los dímeros aislados con una molécula biológicamente activa, en la que dicha molécula biológicamente activa tiene un tioéster activo, de manera que se forme al menos algún híbrido de monómero-dímero y aislar el híbrido de monómero-dímero de dicha mezcla.

La presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o afección que comprende administrar una proteína quimérica de la presente descripción tratando así la enfermedad o afección.

Objetivos y ventajas adicionales de la presente descripción se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvios de la descripción, o pueden aprenderse por la práctica de la presente descripción. Los objetivos y ventajas de la invención se realizarán y obtendrán por medio de los elementos y combinaciones particularmente explicados en las reivindicaciones adjuntas.

Compendio de la invención

Así, basándose en la descripción contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona

una proteína quimérica para uso en un método de tratamiento, con una molécula biológicamente activa y dos regiones constantes de inmunoglobulina o partes de las mismas, en donde la proteína quimérica comprende una primera cadena de polipéptidos y una segunda cadena de polipéptidos,

en la que la primera cadena de polipéptidos comprende una molécula biológicamente activa y una región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma que es un componente de unión a receptor neonatal Fc (FcRn),

y en donde la molécula biológicamente activa es una proteína seleccionada del grupo que consiste en una citocina, una hormona y un factor de coagulación; y

en la que la segunda cadena de polipéptidos consiste en una región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma que es un componente de unión a FcRn y opcionalmente una molécula con un peso molecular no mayor que 2kD.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende dicha proteína quimérica y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención aún proporciona un primer polipéptido que codifica la primera cadena de polipéptidos de dicha proteína quimérica y un segundo polinucleótido que codifica la segunda cadena de polipéptidos de dicha proteína quimérica.

Otros aspectos y realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

- 5 Debe entenderse que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada son solo a modo de ejemplo y explicativas y no son restrictivas de la invención, como se reivindica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático que compara la estructura de un homodímero de EPO-Fc, o dímero, y la estructura de un híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc.

- 10 La Figura 2a es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica factor VII-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula, y el propéptido (negrita), que es reconocido por la γ -carboxilasa dependiente de vitamina K que modifica el factor VII para lograr actividad completa. La secuencia se escinde posteriormente por PACE dando el factor VII-Fc.

- 15 La Figura 2b es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica factor IX-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula, y el propéptido (negrita) que es reconocido por la γ -carboxilasa dependiente de vitamina K que modifica el factor IX para lograr actividad completa. La secuencia se escinde posteriormente por PACE dando el factor IX-Fc.

La Figura 2c es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica IFN α -Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula produciendo IFN α -Fc madura.

- 20 La Figura 2d es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica ligante Δ IFN α -Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado) que es escindido por la célula produciendo ligante Δ de IFN α -Fc madura.

La Figura 2e es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica Flag-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula produciendo Flag-Fc madura.

- 25 La Figura 2f es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica Epo-CCA-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula produciendo Epo-CCA-Fc madura. También se muestra en negrita el dominio de superenrollamiento ácido.

La Figura 2g es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica CCB-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula produciendo CCB-Fc madura. También se muestra en negrita el dominio de superenrollamiento básico.

- 30 La Figura 2h es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica Cys-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula produciendo Cys-Fc madura. Cuando esta secuencia se produce en células CHO, un porcentaje de las moléculas se escinde incorrectamente por la peptidasa señal de forma que dos aminoácidos adicionales quedan sobre el extremo N, previniendo así el enlace de una molécula biológicamente activa con un tioéster en el extremo C (por ejemplo, mediante ligación nativa). Si estas especies inadecuadamente
- 35 escindidas se dimerizan con la Cys-Fc apropiadamente escindida y se hacen reaccionar posteriormente con moléculas biológicamente activas con tioésteres del extremo C, se forman híbridos de monómero-dímero.

La Figura 2i es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica IFN α -GS15-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado) que es escindido por la célula produciendo IFN α -GS15-Fc madura.

- 40 La Figura 2j es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica Epo-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula produciendo Epo-Fc madura. También se muestra en negrita el ligante de 8 aminoácidos.

- 45 La Figura 3a es la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína quimérica factor VII-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado) y el propéptido (negrita) que es reconocido por la γ -carboxilasa dependiente de vitamina K que modifica el factor VII para lograr actividad completa. La secuencia traducida se escinde posteriormente por PACE dando factor VII-Fc madura.

La Figura 3b es la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína quimérica factor IX Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado) y el propéptido (negrita) que es reconocido por la γ -carboxilasa dependiente de vitamina K que modifica el factor IX para lograr actividad completa. La secuencia traducida se escinde posteriormente por PACE dando factor IX-Fc madura.

- 50 La Figura 3c es la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína quimérica IFN α -Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula después de la traducción produciendo IFN α -Fc madura.

- La Figura 3d es la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína quimérica ligante Δ de IFN α -Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado) que es escindido por la célula después de la traducción produciendo ligante Δ de IFN α -Fc maduro.
- 5 La Figura 3e es la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína quimérica Flag-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula después de la traducción produciendo Flag-Fc madura.
- La Figura 3f es la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína quimérica Epo-CCA-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula después de la traducción produciendo Epo-CCA-Fc madura. También se muestra en negrita el dominio de superenrollamiento ácido.
- 10 La Figura 3g es la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína quimérica CCB-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula después de la traducción produciendo CCB-Fc madura. También se muestra en negrita el dominio de superenrollamiento básico.
- La Figura 3h es la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína quimérica Cys-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula después de la traducción produciendo Cys-Fc madura.
- 15 La Figura 3i es la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína quimérica IFN α -GS15-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado) que es escindido por la célula después de la traducción produciendo IFN α -GS15-Fc madura.
- La Figura 3j es la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína quimérica Epo-Fc. En la secuencia se incluye el péptido señal (subrayado), que es escindido por la célula después de la traducción produciendo Epo-Fc madura. También se muestra en negrita una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el ligante de 8 aminoácidos.
- 20 La Figura 4 demuestra rutas para formar híbridos de monómero-dímero mediante ligación nativa.
- La Figura 5a muestra la secuencia de aminoácidos de Fc-MESNA (SEQ ID N°: 4).
- La Figura 5b muestra la secuencia de ADN de Fc-MESNA (SEQ IDSEQ ID N°: 5).
- La Figura 6 compara actividad antiviral de homo-dímero de IFN α (es decir, que comprende 2 moléculas de IFN α) con un híbrido de monómero-dímero de IFN α (es decir, que comprende 1 molécula de IFN α).
- 25 La Figura 7 es una comparación de actividad de coagulación de un híbrido quimérico de monómero-dímero factor VIIa-Fc (molécula de un factor VII) y un homodímero quimérico factor VIIa-Fc (moléculas de dos factores VII).
- La Figura 8 compara la dosificación oral en ratas neonatas de un híbrido quimérico de monómero-dímero factor VIIa-Fc (molécula de un factor VII) y un homodímero quimérico factor VIIa-Fc (moléculas de dos factores VII).
- 30 La Figura 9 compara la dosificación oral en ratas neonatas de un híbrido quimérico de monómero-dímero factor IX-Fc (molécula de un factor IX) con un homodímero quimérico.
- La Figura 10 es un estudio de transcurso del tiempo que compara un híbrido quimérico de monómero-dímero factor IX-Fc (molécula de un factor IX) administrado por vía oral a ratas neonatas con un homodímero quimérico administrado por vía oral.
- 35 La Figura 11 demuestra la farmacocinética del dímero Epo-Fc en comparación con el híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc en monos cinomolgos después de una única dosis pulmonar.
- La Figura 12 compara la concentración en suero en monos de híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc subcutáneamente administrado con Aranesp[®] subcutáneamente administrado (darbepoyetina alfa).
- 40 La Figura 13 compara la concentración en suero en monos de híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc intravenosamente administrado con Aranesp[®] intravenosamente administrado (darbepoyetina alfa) y Epogen[®] (epoyetina alfa).
- La Figura 14 muestra una traza de una columna Mimetic Red 2[™] (ProMetic LifeSciences, Inc., Wayne, NJ) y una SDS-PAGE de fracciones de la columna que contienen híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc, dímero de Epo-Fc y Fc. El híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc se encuentra en las fracciones 11, 12, 13 y 14. El dímero de Epo-Fc se encuentra en la fracción 18. Fc se encuentra en las fracciones 1/2.
- 45 La Figura 15 muestra la farmacocinética de IFN β -Fc con un ligante de 8 aminoácidos en monos cinomolgos después de una única dosis pulmonar.
- La Figura 16 muestra la estimulación de neopterinina en respuesta al homodímero de IFN β -Fc y el híbrido de monómero-dímero de IFN β -Fc N297A en monos cinomolgos.

La Figura 17a muestra la secuencia de nucleótidos de interferón β -Fc; la Figura 17b muestra la secuencia de aminoácidos de interferón β -Fc.

La Figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos de T20(a); T21 (b) y T1249(c).

Descripción de las realizaciones

5 A. Definiciones

Marca de afinidad, como se usa en la presente memoria, significa una molécula unida a una segunda molécula de interés, que puede interactuar con un componente de unión específico con el fin de aislar o identificar dicha segunda molécula de interés.

10 **Análogos** de proteínas quiméricas de la presente descripción, por ejemplo, de proteínas quiméricas de la presente invención, o proteínas o péptidos sustancialmente idénticos a las proteínas quiméricas de la presente descripción, por ejemplo, a las proteínas quiméricas de la presente invención, como se usa en la presente memoria, significa que una secuencia de aminoácidos relevante de una proteína o un péptido es al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o el 100% idéntica a una secuencia dada. A modo de ejemplo, tales secuencias pueden ser
15 variantes derivadas de diversas especies, o pueden derivarse de la secuencia dada por truncación, delección, sustitución o adición de aminoácidos. La identidad en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos se determina por algoritmos de alineamiento convencionales tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito en Altschul y col. 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410, el algoritmo de Needleman y col. 1970, J. Mol. Biol., 48:444-453; el algoritmo de Meyers y col. 1988, Comput. Appl. Biosci., 4:11-17; o Tatusova y col. 1999, FEMS Microbiol. Lett., 174:247-250, etc. Tales algoritmos se incorporan en los programas BLASTN, BLASTP y "BLAST 2
20 Sequences" (véase www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Si se utilizan tales programas, pueden usarse parámetros por defecto. Por ejemplo, para secuencias de nucleótidos pueden usarse los siguientes parámetros para "BLAST 2 Sequences": programa BLASTN, recompensa por apareamiento 2, penalización por desapareamiento -2, penalizaciones por hueco abierto y extensión de hueco 5 y 2 respectivamente, gap x_dropoff 50, esperado 10, tamaño de palabra 11, filtro ON. Para secuencias de aminoácidos pueden usarse los siguientes parámetros para
25 "BLAST 2 Sequences": programa BLASTP, matriz BLOSUM62, penalizaciones por hueco abierto y extensión de hueco 11 y 1, respectivamente, gap x_dropoff 50, esperado 10, tamaño de palabra 3, filtro ON.

La **biodisponibilidad**, como se usa en la presente memoria, significa el grado y tasa a la que una sustancia se absorbe en un sistema vivo o se provee en el sitio de actividad fisiológica.

30 **Molécula biológicamente activa**, como se usa en la presente memoria, significa una molécula de no inmunoglobulina o fragmento de la misma que puede tratar una enfermedad o afección o localizar o elegir como diana una molécula para un sitio de una enfermedad o afección en el cuerpo realizando una función o una acción, o estimulando o respondiendo a una función, una acción o una reacción, en un contexto biológico (por ejemplo, en un organismo, una célula o un modelo *in vitro* de la misma). Las moléculas biológicamente activas pueden comprender al menos uno de polipéptidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas tales como moléculas orgánicas o inorgánicas
35 pequeñas.

Una **proteína quimérica**, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier proteína que comprende una primera secuencia de aminoácidos derivada de una primera fuente, unida, covalentemente o no covalentemente, a una segunda secuencia de aminoácidos derivada de una segunda fuente, en la que la primera y segunda fuente no son las mismas. Una primera fuente y una segunda fuente que no son las mismas pueden incluir dos entidades biológicas diferentes, o dos proteínas diferentes de la misma entidad biológica, o una entidad biológica y una entidad no biológica. Una proteína quimérica puede incluir, por ejemplo, una proteína derivada de al menos 2 fuentes biológicas diferentes. Una fuente biológica puede incluir cualquier secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos no sintéticamente producida (por ejemplo, una secuencia genómica o ADNc, un plásmido o vector viral, un virión nativo o un mutante o análogo, como se describe adicionalmente en la presente memoria, de cualquiera de los
40 anteriores). Una fuente sintética puede incluir una secuencia de proteínas o de ácidos nucleicos producida químicamente y no por un sistema biológico (por ejemplo, síntesis en fase sólida de secuencias de aminoácidos). Una proteína quimérica también puede incluir una proteína derivada de al menos 2 fuentes sintéticas diferentes o una proteína derivada de al menos una fuente biológica y al menos una fuente sintética. Una proteína quimérica también puede comprender una primera secuencia de aminoácidos derivada de una primera fuente, ligada covalentemente o no covalentemente a un ácido nucleico, derivada de cualquier fuente o una molécula orgánica o inorgánica pequeña derivada de cualquier fuente. La proteína quimérica puede comprender una molécula de ligante entre la primera y segunda secuencia de aminoácidos o entre la primera secuencia de aminoácidos y el ácido nucleico, o entre la primera secuencia de aminoácidos y la molécula orgánica o inorgánica pequeña.
50

55 **Factor de coagulación**, como se usa en la presente memoria, significa cualquier molécula, o análogo de la misma, que se produce naturalmente o se produce recombinantemente que previene o disminuye la duración de un episodio hemorrágico en un sujeto con un trastorno hemostático. En otras palabras, significa cualquier molécula que tiene actividad de coagulación.

Actividad de coagulación, como se usa en la presente memoria, significa la capacidad para participar en una

cascada de reacciones bioquímicas que culmina en la formación de un coágulo de fibrina y/o reduce la gravedad, duración o frecuencia de hemorragia o episodio hemorrágico.

5 **Dímero**, como se usa en la presente memoria, se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en la que la primera y segunda cadenas comprenden ambas una molécula biológicamente activa, y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina. Un homodímero se refiere a un dímero en el que ambas moléculas biológicamente activas son las mismas.

10 **Híbrido de monómero-dímero diméricamente ligado** se refiere a una proteína quimérica que comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento Fc de una inmunoglobulina, una molécula biológicamente activa y un ligante que liga las dos juntas de forma que una molécula biológicamente activa esté unida a 2 cadenas de polipéptidos, comprendiendo cada una una parte de una región constante de inmunoglobulina. La Figura 4 muestra un ejemplo de un híbrido de monómero-dímero diméricamente ligado.

15 **Construcción de ADN**, como se usa en la presente memoria, significa una molécula de ADN, o un clon de una molécula tal, tanto mono como bicatenaria, que ha sido modificada mediante intervención humana para contener segmentos de ADN combinados de un modo que, en conjunto, no existiría de otro modo en la naturaleza. Las construcciones de ADN contienen la información necesaria para dirigir la expresión de polipéptidos de interés. Las construcciones de ADN pueden incluir promotores, potenciadores y terminadores de la transcripción. Las construcciones de ADN que contienen la información necesaria para dirigir la secreción de un polipéptido también contendrán al menos una secuencia señal secretora.

20 **Dominio**, como se usa en la presente memoria, significa una región de un polipéptido (incluyendo proteínas como se define ese término) que tienen alguna característica o función física distintiva que incluye, por ejemplo, una estructura independientemente plegada que comprende una sección de una cadena de polipéptidos. Un dominio puede contener la secuencia de la característica física distintiva del polipéptido o puede contener un fragmento de la característica física que retiene sus características de unión (es decir, puede unirse a un segundo dominio). Un dominio puede asociarse a otro dominio. En otras palabras, un primer dominio puede unirse naturalmente a un
25 segundo dominio.

Un **fragmento**, como se usa en la presente memoria, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 2 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, o de al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos o cualquier delección o truncación de una proteína, péptido o polipéptido.
30

La **hemostasia**, como se usa en la presente memoria, significa la interrupción del sangrado o hemorragia; o la interrupción de la circulación sanguínea a través de un vaso sanguíneo o parte del cuerpo.

35 **Trastorno hemostático**, como se usa en la presente memoria, significa una afección genéticamente heredada o adquirida caracterizada por una tendencia a hemorragia, tanto espontáneamente o como resultado de traumatismo, debido a una capacidad alterada o incapacidad para formar un coágulo de fibrina.

40 **Ligada**, como se usa en la presente memoria, se refiere a una primera secuencia de ácidos nucleicos covalentemente unida a una segunda secuencia de ácidos nucleicos. La primera secuencia de ácidos nucleicos puede estar directamente unida o yuxtapuesta a la segunda secuencia de ácidos nucleicos o alternativamente una secuencia interviniente puede unir covalentemente la primera secuencia con la segunda secuencia. Ligada como se usa en la presente memoria también puede referirse a una primera secuencia de aminoácidos covalentemente, o no covalentemente, unida a una segunda secuencia de aminoácidos. La primera secuencia de aminoácidos puede unirse directamente o yuxtaponerse a la segunda secuencia de aminoácidos o alternativamente una secuencia interviniente puede unir covalentemente la primera secuencia de aminoácidos con la segunda secuencia de aminoácidos.
45

Operativamente ligada, como se usa en la presente memoria, significa una primera secuencia de ácidos nucleicos ligada a una segunda secuencia de ácidos nucleicos de forma que ambas secuencias puedan expresarse como una proteína o péptido biológicamente activo.

50 **Polipéptido**, como se usa en la presente memoria, se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto; así, péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido. Este término no excluye modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, acetilación, fosforilación, PEGilación, adición de un resto de lípido, o la adición de cualquier molécula orgánica o inorgánica. Incluidos dentro de la definición están, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales) y polipéptidos con enlaces sustituidos, además de otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto que se producen naturalmente como que no se producen naturalmente.
55

Alta rigurosidad, como se usa en la presente memoria, incluye condiciones fácilmente determinadas por el experto basadas en, por ejemplo, la longitud del ADN. Generalmente, tales condiciones se definen en Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. vol. 1, pág. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), e incluyen uso de una disolución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, 0,5% de SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación de 50% de formamida, 6X SSC a 42 °C (u otra disolución de hibridación similar, tal como disolución de Stark, en 50% de formamida a 42 °C, y con lavado a aproximadamente 68 °C, 0,2X SSC, 0,1% de SDS). El experto reconocerá que la temperatura y la concentración de sales de la disolución de lavado pueden ajustarse según sea necesario según factores tales como la longitud de la sonda.

Rigurosidad moderada, como se usa en la presente memoria, incluye condiciones que pueden determinarse fácilmente por aquellos expertos habituales en la materia basándose en, por ejemplo, la longitud del ADN. Las condiciones básicas se exponen por Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. vol. 1, pág. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), e incluyen uso de una disolución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, 0,5% de SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación de 50% de formamida, 6X SSC a 42 °C (u otra disolución de hibridación similar, tal como disolución de Stark, en 50% de formamida a 42 °C), y condiciones de lavado de 60 °C, 0,5X SSC, 0,1% de SDS.

Una **molécula inorgánica pequeña**, como se usa en la presente memoria, significa una molécula que no contiene átomos de carbono y que no tiene más de 50 kD.

Una **molécula orgánica pequeña**, como se usa en la presente memoria, significa una molécula que contiene al menos un átomo de carbono y que no tiene más de 50 kD.

Tratar, tratamiento, tratando, como se usa en la presente memoria, significa cualquiera de lo siguiente: la reducción en la gravedad de una enfermedad o afección; la reducción en la duración de un transcurso de enfermedad; la mejora de uno o más síntomas asociados a una enfermedad o afección; la provisión de efectos beneficiosos a un sujeto con una enfermedad o afección, sin curar necesariamente la enfermedad o afección, la profilaxis de uno o más síntomas asociados a una enfermedad o afección.

B. Mejoras ofrecidas por ciertas realizaciones de la invención

La presente descripción proporciona proteínas quiméricas (híbridos de monómero-dímero) que comprenden una primera y una segunda cadena de polipéptidos, en las que dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin ninguna molécula biológicamente activa o región variable de una inmunoglobulina. La Figura 1 compara dímeros de proteína de fusión tradicionales con un ejemplo del híbrido de monómero-dímero de la presente descripción (cuyo ejemplo es, además, una realización de la presente invención). En este ejemplo, la molécula biológicamente activa es EPO y la parte de una inmunoglobulina es la región Fc de IgG.

Al igual que otras proteínas quiméricas que comprenden al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, la presente descripción, que incluye la presente invención, proporciona proteínas quiméricas que proporcionan estabilidad potenciada y elevada biodisponibilidad de la proteína quimérica en comparación con la molécula biológicamente activa sola. Adicionalmente, sin embargo, debido a que solo una de las dos cadenas comprende la molécula biológicamente activa, la proteína quimérica tiene un menor peso molecular que una proteína quimérica en la que todas las cadenas comprenden una molécula biológicamente activa y, aunque no se desee quedar ligado a teoría particular, esto puede hacer que la proteína quimérica sea más fácilmente transcitada a través de la barrera del epitelio, por ejemplo, uniéndose al receptor FcRn, aumentando así la semivida de la proteína quimérica. En un caso, la presente descripción proporciona así un procedimiento no invasivo mejorado (por ejemplo, mediante cualquier superficie de la mucosa tal como por vía oral, bucalmente, sublingualmente, nasalmente, rectalmente, vaginalmente, o mediante vía pulmonar u ocular) de administrar una proteína quimérica terapéutica de la presente descripción, por ejemplo, una proteína quimérica de la presente invención. Así, la presente descripción proporciona procedimientos de obtención de niveles terapéuticos de las proteínas quiméricas de la presente descripción, por ejemplo, de las proteínas quiméricas de la presente invención, usando dosis menos frecuentes y menores en comparación con proteínas quiméricas previamente descritas (por ejemplo, proteínas quiméricas que comprenden al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y una molécula biológicamente activa, en la que todas las cadenas de la proteína quimérica comprenden una molécula biológicamente activa).

En otro caso, la presente descripción proporciona un procedimiento invasivo, por ejemplo, subcutáneamente, intravenosamente, de administración de una proteína quimérica terapéutica de la presente descripción, por ejemplo, una proteína quimérica terapéutica de la presente invención. La administración invasiva de la proteína quimérica terapéutica de la presente descripción, por ejemplo, de la proteína quimérica terapéutica de la presente invención, proporciona una elevada semivida de la proteína quimérica terapéutica que se produce usando dosis menos frecuentes y menores en comparación con proteínas quiméricas previamente descritas (por ejemplo, proteínas quiméricas que comprenden al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y una molécula biológicamente activa, en la que todas las cadenas de la proteína quimérica comprenden una molécula biológicamente activa).

Todavía otra ventaja de una proteína quimérica en la que solo una de las cadenas comprende una molécula biológicamente activa es la accesibilidad potenciada de la molécula biológicamente activa para su célula diana o molécula resultante de impedimento estérico disminuido, interacciones hidrófobas disminuidas, interacciones iónicas disminuidas o peso molecular disminuido en comparación con una proteína quimérica en la que todas las cadenas comprenden una molécula biológicamente activa.

C. Proteínas quiméricas

La presente descripción se refiere a proteínas quiméricas que comprenden una molécula biológicamente activa, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y opcionalmente al menos un ligante. La parte de una inmunoglobulina tendrá tanto un extremo N, o amino, como un extremo C, o carboxi. La proteína quimérica puede tener la molécula biológicamente activa ligada al extremo N de la parte de una inmunoglobulina. Alternativamente, la molécula biológicamente activa puede ligarse al extremo C de la parte de una inmunoglobulina. En un caso, el enlace es un enlace covalente. En otra realización, el enlace es un enlace no covalente.

La proteína quimérica puede comprender opcionalmente al menos un ligante; así, la molécula biológicamente activa no tiene que estar directamente ligada a la parte de una región constante de inmunoglobulina. El ligante puede intervenir entre la molécula biológicamente activa y la parte de una región constante de inmunoglobulina. El ligante puede ligarse al extremo N de la parte de una región constante de inmunoglobulina, o al extremo C de la parte de una región constante de inmunoglobulina. Si la molécula biológicamente activa comprende al menos un aminoácido, la molécula biológicamente activa tendrá un extremo N y un extremo C y el ligante puede ligarse al extremo N de la molécula biológicamente activa, o al extremo C de la molécula biológicamente activa.

La presente descripción se refiere a una proteína quimérica de fórmula $X-L_a-F:F$ o $F:F-L_a-X$ en las que X es una molécula biológicamente activa, L es un ligante opcional, F es al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y a es cualquier número entero o cero. La presente descripción también se refiere a una proteína quimérica de fórmula $T_a-X-L_a-F:F$ o $T_a-F:F-L_a-X$ en las que X es una molécula biológicamente activa, L es un ligante opcional, F es al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, a es cualquier número entero o cero, T es un segundo ligante o alternativamente una marca que puede usarse para facilitar la purificación de la proteína quimérica, por ejemplo, una marca FLAG, una marca de histidina, una marca GST, una marca de proteína de unión a maltosa y (:) representa una asociación química, por ejemplo, al menos un enlace no peptídico. En ciertos casos, la asociación química, es decir, (:) es un enlace covalente. En otros casos, la asociación química, es decir, (:) es una interacción no covalente, por ejemplo, una interacción iónica, una interacción hidrófoba, una interacción hidrófila, una interacción de Van der Waals, un enlace de hidrógeno. Se entenderá por el experto que cuando a es igual a cero X se ligará directamente a F. Así, por ejemplo, a puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, o superior a 5.

En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 2a (SEQ IDSEQ ID N°: 6). En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 2b (SEQ IDSEQ ID N°: 8). En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 2c (SEQ IDSEQ ID N°: 10). En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 2d (SEQ IDSEQ ID N°: 12). En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 2e (SEQ IDSEQ ID N°: 14). En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 2f (SEQ IDSEQ ID N°: 16). En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 2g (SEQ IDSEQ ID N°: 18). En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 2h (SEQ IDSEQ ID N°: 20). En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 2i (SEQ IDSEQ ID N°: 22). En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 2j (SEQ IDSEQ ID N°: 24). En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 17b (SEQ IDSEQ ID N°: 27).

Basado en la descripción que se ha proporcionado anteriormente, y en la descripción contenida en cualquier otro sitio de la presente memoria, la presente invención proporciona proteínas quiméricas dentro del alcance de la reivindicación 1 del apéndice.

1. Variantes de proteínas quiméricas

Derivados de las proteínas quiméricas de la presente descripción, que incluyen las proteínas quiméricas de la presente invención, anticuerpos contra tales proteínas quiméricas y anticuerpos contra componentes de unión de tales proteínas quiméricas, son todos contemplados, y pueden prepararse alterando sus secuencias de aminoácidos por sustituciones, adiciones y/o deleciones/truncaciones o introduciendo modificación química que produce moléculas funcionalmente equivalentes. Se entenderá por un experto habitual en la materia que ciertos aminoácidos en una secuencia de cualquier proteína pueden estar sustituidos por otros aminoácidos sin afectar adversamente la actividad de la proteína.

Pueden hacerse diversos cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas quiméricas de la presente descripción, por ejemplo, de las proteínas quiméricas de la presente invención, o en secuencias de ADN que las

codifican sin pérdida apreciable de su actividad, función o utilidad biológica. Derivados, análogos o mutantes resultantes de tales cambios y el uso de tales derivados están dentro del alcance de la presente descripción. En un caso específico, el derivado es funcionalmente activo, es decir, puede presentar una o más actividades asociadas a las proteínas quiméricas de la presente descripción, por ejemplo, de las proteínas quiméricas de la invención, por ejemplo, unión a FcRn, inhibición viral, hemostasia, producción de glóbulos rojos. Muchos ensayos que pueden probar la actividad de una proteína quimérica que comprende una molécula biológicamente activa se conocen en la técnica. Si la molécula biológicamente activa es un inhibidor del VIH, la actividad puede probarse midiendo la actividad de transcriptasa inversa usando procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, Barre-Sinoussi y col. 1983, Science 220:868; Gallo y col. 1984, Science 224:500). Alternativamente, la actividad puede medirse midiendo la actividad fusogénica (véase, por ejemplo, Nussbaum y col. 1994, J. Virol. 68(9):5411). Si la actividad biológica es hemostasia, puede realizarse un ensayo de FVIIa-rTF StaCLot para evaluar la actividad de derivados del factor VIIa (Johannessen y col. 2000, Blood Coagulation and Fibrinolysis 11:S159).

Sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que el aminoácido pertenece (véase la Tabla 1). Además, diversos aminoácidos están comúnmente sustituidos con aminoácidos neutros, por ejemplo, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina (véase, por ejemplo, MacLennan y col. 1998, Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67; Sasaki y col. 1998, Adv. Biophys. 35:1-24).

TABLA 1

Residuos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones típicas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, ácido 1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

20 2. Moléculas biológicamente activas

En las realizaciones de la presente invención, la molécula biológicamente activa es una proteína seleccionada del grupo que consiste en una citosina, una hormona y un factor de coagulación (ejemplos de los cuales se proporcionan en la siguiente descripción). Sin embargo, la presente descripción contempla más generalmente el uso de cualquier molécula biológicamente activa como la molécula terapéutica de la presente descripción. La molécula

biológicamente activa puede ser un polipéptido. La molécula biológicamente activa puede ser un único aminoácido. La molécula biológicamente activa puede incluir un polipéptido modificado.

5 La molécula biológicamente activa puede incluir una molécula de lípido (por ejemplo, un esteroide o colesterol, un ácido graso, un triacilglicerol, glicerofosfolípido, o esfingolípido). La molécula biológicamente activa puede incluir una molécula de azúcar (por ejemplo, glucosa, sacarosa, manosa). La molécula biológicamente activa puede incluir una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN). La molécula biológicamente activa puede incluir una molécula orgánica pequeña o una molécula inorgánica pequeña.

a. Citocinas y factores de crecimiento

10 En un caso, la molécula biológicamente activa es un factor de crecimiento, hormona o citocina, o análogo o fragmento de los mismos. La molécula biológicamente activa puede ser cualquier agente que pueda inducir crecimiento y proliferación celular. En un caso específico, la molécula biológicamente activa es cualquier agente que pueda inducir eritrocitos para proliferar. Así, un ejemplo de una molécula biológicamente activa contemplada por la presente descripción es EPO. La molécula biológicamente activa también puede incluir, pero no se limita a, RANTES, MIP1 α , MIP1 β , IL-2, IL-3, GM-CSF, hormona de crecimiento, factor de necrosis tumoral (por ejemplo, 15 TNF α o β).

La molécula biológicamente activa puede incluir interferón α , tanto si se produce sintéticamente como recombinantemente, que incluye, pero no se limita a, uno cualquiera de los aproximadamente veinticinco subtipos estructuralmente relacionados como, por ejemplo, interferón- α 2a, ahora comercialmente disponible para uso clínico (ROFERON®, Roche) e interferón- α 2b, también aprobado para uso clínico (INTRON®, Schering), además de 20 versiones genéticamente manipuladas de diversos subtipos, que incluyen, pero no se limitan a, interferón α consenso comercialmente disponible (INFERGEN®, Intermune, desarrollado por Amgen) e interferón de leucocitos humanos consenso, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.695.623; 4.897.471, interferón β , factor de crecimiento epidérmico, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), leuprolida, hormona estimulante del folículo, progesterona, estrógeno o testosterona.

25 Previamente se ha descrito una lista de citocinas y factores de crecimiento que pueden usarse en la proteína quimérica de la presente descripción (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.086.875, 6.485.726, 6.030.613; WO 03/077834; US2003-0235536A1).

b. Agentes antivirales

30 En un caso, la molécula biológicamente activa es un agente antivírico, que incluye fragmentos y análogos del mismo. Un agente antivírico puede incluir cualquier molécula que inhiba o prevenga la replicación viral, o inhiba o prevenga la entrada viral en una célula, o inhiba o prevenga la salida viral de una célula. En un caso, el agente antiviral es un inhibidor de la fusión. En un caso, el agente antiviral es una citocina que inhibe la replicación viral. En otro caso, el agente antiviral es interferón α .

35 El inhibidor de la fusión viral para su uso en la proteína quimérica puede ser cualquier molécula que disminuya o prevenga la penetración viral de una membrana celular de una célula diana. El inhibidor de la fusión viral puede ser cualquier molécula que disminuya o prevenga la formación de sincitios entre al menos dos células susceptibles. El inhibidor de la fusión viral puede ser cualquier molécula que disminuya o prevenga la unión de una membrana bicapa lipídica de una célula eucariota y una bicapa lipídica de un virus envuelto. Ejemplos de virus envueltos incluyen, pero no se limitan a, VIH-1, VIH-2, SIV, gripe, paragripe, virus de Epstein-Barr, CMV, herpes simple 1, 40 herpes simple 2 y virus respiratorio sincitial.

El inhibidor de la fusión viral puede ser cualquier molécula que disminuya o prevenga la fusión viral que incluye, pero no se limita a, un polipéptido, una molécula orgánica pequeña o una molécula inorgánica pequeña. En un caso, el inhibidor de la fusión es un polipéptido. En un caso, el inhibidor de la fusión viral es un polipéptido de 3-36 aminoácidos. En otro caso, el inhibidor de la fusión viral es un polipéptido de 3-50 aminoácidos, 10-65 aminoácidos, 45 10-75 aminoácidos. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que se produce naturalmente (por ejemplo, un fragmento de gp41) que incluye análogos y mutantes de la misma o el polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos no encontrada en la naturaleza, mientras que el polipéptido presente la actividad inhibidora de la fusión viral.

50 En un caso, el inhibidor de la fusión viral es un polipéptido, identificado como un inhibidor de la fusión viral usando al menos un algoritmo informático, por ejemplo, ALLMOT15, 107x178x4 y PLZIP (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.013.263; 6.015.881; 6.017.536; 6.020.459; 6.060.065; 6.068.973; 6.093.799; y 6.228.983).

55 En un caso, el inhibidor de la fusión viral es un inhibidor de la fusión del VIH. En un caso, el VIH es VIH-1. En otro caso, el VIH es VIH-2. En un caso, el inhibidor de la fusión del VIH es un polipéptido que comprende un fragmento de la proteína de la envuelta gp41 de VIH-1. El inhibidor de la fusión del VIH puede comprender, por ejemplo, T20 (SEQ IDSEQ ID N°: 1) o un análogo del mismo, T21 (SEQ IDSEQ ID N°: 2) o un análogo del mismo, T1249 (SEQ IDSEQ ID N°: 3) o un análogo del mismo, N_{CC}gp41 (Louis y col. 2001, *J. Biol. Chem.* 276:(31)29485) o un análogo

del mismo, o hélice 5 (Root y col. 2001, Science 291:884) o un análogo del mismo.

Pueden usarse ensayos conocidos en la técnica para probar la actividad inhibidora de la fusión viral de un polipéptido, una molécula orgánica pequeña o una molécula inorgánica pequeña. Estos ensayos incluyen un ensayo con transcriptasa inversa, un ensayo con p24, o ensayo de formación de sincitios (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.464.933).

Previamente se ha descrito una lista de agentes antivirales que pueden usarse en la proteína quimérica de la presente descripción (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.086.875, 6.485.726, 6.030.613; documentos WO 03/077834; US2003-0235536A1).

c. Agentes hemostáticos

En un caso, la molécula biológicamente activa es un factor de coagulación u otro agente que promueve la hemostasia, que incluye fragmentos y análogos del mismo. El factor de coagulación puede incluir cualquier molécula que tenga actividad de coagulación o active una molécula con actividad de coagulación. El factor de coagulación puede comprender un polipéptido. El factor de coagulación puede ser, como un ejemplo, pero no se limita a, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XII, fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factor X, factor XIII o factor de von Willebrand. En un caso, el factor de coagulación es factor VII o factor VIIa. El factor de coagulación puede ser un factor que participe en la ruta extrínseca. El factor de coagulación puede ser un factor que participe en la ruta intrínseca. Alternativamente, el factor de coagulación puede ser un factor que participe en tanto la ruta extrínseca como intrínseca.

El factor de coagulación puede ser un factor de coagulación humano o un factor de coagulación no humano, por ejemplo, derivado de un primate no humano, un cerdo o cualquier mamífero. El factor de coagulación puede ser factor de coagulación quimérico, por ejemplo, el factor de coagulación puede comprender una parte de un factor de coagulación humano y una parte de un factor de coagulación porcino, o una parte de un primer factor de coagulación no humano y una parte de un segundo factor de coagulación no humano.

El factor de coagulación puede ser un factor de coagulación activado. Alternativamente, el factor de coagulación puede ser una forma inactiva de un factor de coagulación, por ejemplo, un zimógeno. El factor de coagulación inactivo puede experimentar activación posterior a ser ligado a al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina. El factor de coagulación inactivo puede activarse posterior a la administración a un sujeto. Alternativamente, el factor de coagulación inactivo puede activarse antes de la administración.

En ciertos casos, una endopeptidasa, por ejemplo, enzima escisora de aminoácidos básicos apareados (PACE), o cualquier miembro de la familia PACE, tal como PCSK1-9, que incluye versiones truncadas de la misma, o su equivalente de levadura Kex2 de *S. cerevisiae* y versiones truncadas de Kex2 (Kex2 1-675) (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.077.204; 5.162.220; 5.234.830; 5.885.821; 6.329.176) pueden usarse para escindir un propéptido para formar la proteína quimérica madura de la presente descripción (por ejemplo factor VII, factor IX).

d. Otras moléculas biológicamente activas proteínicas

En un caso de la presente descripción, la molécula biológicamente activa es un receptor o un fragmento o análogo del mismo. El receptor puede expresarse sobre una superficie celular, o alternativamente el receptor puede expresarse sobre el interior de la célula. El receptor puede ser un receptor viral, por ejemplo, CD4, CCR5, CXCR4, CD21, CD46. La molécula biológicamente activa puede ser un receptor bacteriano. La molécula biológicamente activa puede ser una proteína de la matriz extracelular o fragmento o análogo de la misma, importante en la colonización e infección bacteriana (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.648.240; 5.189.015; 5.175.096) o una proteína de la superficie bacteriana importante en adhesión e infección (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.648.240). La molécula biológicamente activa puede ser un factor de crecimiento, hormona o receptor de citocina, o un fragmento o análogo del mismo, por ejemplo, receptor de TNF α , el receptor de eritropoyetina, CD25, CD 122 o CD132.

Previamente se ha descrito una lista de otras moléculas proteínicas que pueden usarse en la proteína quimérica de la presente descripción (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.086.875; 6.485.726; 6.030.613; documentos WO 03/077834; US2003-0235536A1).

e. Ácidos nucleicos

En un caso, la molécula biológicamente activa es un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, ARN. En un caso específico, la molécula biológicamente activa es un ácido nucleico que puede usarse en ARN interferente (ARNi). La molécula de ácido nucleico puede ser como ejemplo, pero no como limitación, una molécula antisentido o una ribozima o un aptámero.

Las moléculas de ARN y ADN antisentido actúan directamente bloqueando la traducción de ARNm hibridándose con ARNm elegido como diana y previniendo la traducción de proteínas. Enfoques antisentido implican el diseño de oligonucleótidos que son complementarios a una ARNm de gen diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a

los transcritos de ARNm del gen diana complementario y prevendrán la traducción. No se requiere complementariedad absoluta.

Una secuencia "complementaria" a una parte de un ARN, como se denomina en la presente memoria, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para poder hibridarse con el ARN, formando un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido bicatenarios, una hebra sencilla del ADN dúplex puede así probarse, o puede ensayarse la formación de tríplex. La capacidad para hibridarse dependerá de tanto el grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico de hibridación, más desapareamientos de bases con un ARN puede contener y todavía formar un dúplex estable (o tríplex, según lo requiera el caso). Un experto en la materia puede determinar un grado tolerable de desapareamiento usando procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Los ácidos nucleicos antisentido deben tener al menos seis nucleótidos de longitud, y son preferentemente oligonucleótidos que oscilan de 6 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En aspectos específicos, el oligonucleótido tiene al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN, o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. El oligonucleótido puede modificarse en el resto de base, el resto de azúcar o esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como polipéptidos (por ejemplo, para elegir como diana receptores de células huésped que eligen diana *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger y col. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553; Lemaitre y col. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648; documento WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, el documento WO 89/10134), agentes de escisión provocada por la hibridación (véase, por ejemplo, Krol y col. 1988, BioTechniques 6:958) o agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon 1988, Pharm. Res. 5:539). Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un polipéptido, agente de reticulación provocada por la hibridación, agente de transporte, o agentes de escisión provocada por la hibridación.

También pueden usarse moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente transcritos de ARNm de gen diana para prevenir la traducción de mRNA de gen diana y, por tanto, la expresión de producto génico diana (véase, por ejemplo, el documento WO 90/11364; Sarver y col. 1990, Science 247, 1222-1225).

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas que pueden catalizar la escisión específica de ARN (véase Rossi 1994, Current Biology 4:469). El mecanismo de acción de las ribozimas implica hibridación específica de secuencias de la molécula de ribozima con ARN diana complementario, seguido de un evento de escisión endonucleolítica. La composición de moléculas de ribozima debe incluir una o más secuencias complementarias al ARNm de gen diana, y debe incluir la muy conocida secuencia catalítica responsable de la escisión de ARNm. Para esta secuencia, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.093.246.

En un caso, las ribozimas que escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específicas para sitio pueden usarse para destruir ARNm de gen diana. En otro caso se contempla el uso de ribozimas en cabeza de martillo. La ribozima en cabeza de martillo escinde ARNm en localizaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm diana. El único requisito es que el ARNm tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas en cabeza de martillo es muy conocida en la técnica y se describe más completamente en Myers 1995, Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VGH Publishers, Nueva York, y en Haseloff y Gerlach 1988, Nature, 334:585.

f. Moléculas pequeñas

La presente descripción también contempla el uso de cualquier molécula pequeña terapéutica o fármaco como molécula biológicamente activa en la proteína quimérica de la presente descripción. Previamente se ha descrito una lista de moléculas pequeñas y fármacos que pueden usarse en la proteína quimérica de la presente descripción (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.086.875; 6.485.726; 6.030.613; documentos WO 03/077834; US2003-0235536A1).

2. Inmunoglobulinas

Las proteínas quiméricas de la presente descripción comprenden al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas comprenden cuatro cadenas de proteínas que se asocian covalentemente - dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena comprende adicionalmente una región variable y una región constante. Dependiendo del isotipo de inmunoglobulina, la región constante de la cadena pesada comprende 3 ó 4 dominios de la región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, CH4). Algunos isotipos comprenden adicionalmente una región bisagra.

La parte de una región constante de inmunoglobulina puede obtenerse de cualquier mamífero. La parte de una región constante de inmunoglobulina puede incluir una parte de una región constante de inmunoglobulina humana, una región constante de inmunoglobulina de primate no humano, una región constante de inmunoglobulina bovina,

una región constante de inmunoglobulina porcina, una región constante de inmunoglobulina murina, una región constante de inmunoglobulina ovina o una región constante de inmunoglobulina de rata.

La parte de una región constante de inmunoglobulina puede producirse recombinantemente o sintéticamente. La inmunoglobulina puede aislarse de una biblioteca de ADNc. La parte de una región constante de inmunoglobulina puede aislarse de una biblioteca de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty y col. 1990, Nature 348:552, Kang y col. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363; documento EP 0 589 877 B1). La parte de una región constante de inmunoglobulina puede obtenerse por barajado de genes de secuencias conocidas (Mark y col. 1992, Bio/Technol. 10:779). La parte de una región constante de inmunoglobulina puede aislarse por recombinación *in vivo* (Waterhouse y col. 1993, Nucl. Acid Res. 21:2265). La inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina humanizada (patente de EE.UU. 5.585.089, Jones y col. 1986, Nature 332:323).

La parte de una región constante de inmunoglobulina puede incluir una parte de una IgG, una IgA, una IgM, una IgD o una IgE. En un caso, la inmunoglobulina es una IgG. En otro caso, la inmunoglobulina es IgG1. En otro caso, la inmunoglobulina es IgG2.

La parte de una región constante de inmunoglobulina puede incluir la región constante de la cadena pesada entera, o un fragmento o análogo de la misma. En un caso, una región constante de la cadena pesada puede comprender un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y/o una región bisagra. En otro caso, una región constante de la cadena pesada puede comprender un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y/o un dominio CH4.

La parte de una región constante de inmunoglobulina puede incluir un fragmento Fc. Un fragmento Fc puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina y la región bisagra de la inmunoglobulina. El fragmento Fc puede ser el fragmento Fc de una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4. En un caso específico, la parte de una región constante de inmunoglobulina es un fragmento Fc de una IgG1. En otro caso, la parte de una región constante de inmunoglobulina es un fragmento Fc de una IgG2.

Como se ha discutido en cualquier parte en la presente memoria, las proteínas quiméricas de la presente invención comprenden al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina que es un componente de unión a receptor neonatal de Fc (FcRn). Esto refleja otro caso de la presente descripción, en el que la parte de una región constante de inmunoglobulina es un componente de unión a FcRn. Un componente de unión a FcRn es cualquier molécula que pueda unirse específicamente por el receptor FcRn con posterior transporte activo por el receptor FcRn del componente de unión a FcRn. Específicamente unido se refiere a dos moléculas que forman un complejo que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y una capacidad de baja a moderada como se distingue de la unión no específica que normalmente tiene una baja afinidad con una capacidad de moderada a alta. Normalmente, la unión se considera específica si la constante de afinidad K_A es superior a 10^6 M^{-1} , o más preferentemente superior a 10^8 M^{-1} . Si fuera necesario, la unión no específica puede reducirse sin afectar sustancialmente la unión específica variando las condiciones de unión. Las condiciones de unión apropiadas tales como concentración de las moléculas, fuerza iónica de la disolución, temperatura, tiempo permitido para la unión, concentración de un agente de bloqueo (por ejemplo, albúmina de suero, caseína de la leche), etc., pueden optimizarse por un experto usando técnicas rutinarias.

El receptor FcRn ha sido aislado de varias especies de mamífero que incluyen seres humanos. Se conocen secuencias de FcRn humano, FcRn de mono, FcRn de rata y FcRn de ratón (Story y col. 1994, J. Exp. Med. 180:2377). El receptor FcRn se une a IgG (pero no a otras clases de inmunoglobulina tales como IgA, IgM, IgD y IgE) a pH relativamente bajo, transporta activamente la IgG transcelularmente en una dirección de luminal a serosal y luego libera la IgG a pH relativamente mayor encontrado en los fluidos intersticiales. Se expresa en tejido epitelial adulto (patentes de EE.UU. 6.485.726, 6.030.613, 6.086.875; documentos WO 03/077834; US2003-0235536A1) que incluye epitelio de pulmón e intestinal (Israel y col. 1997, Immunology 92:69), epitelio tubular proximal renal (Kobayashi y col. 2002, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 282:F358), además de epitelio nasal, superficies vaginales y superficies de las vías biliares.

Los componentes de unión a FcRn para su uso según la presente descripción, que incluyen la presente invención, engloban cualquier molécula que pueda unirse específicamente por el receptor FcRn que incluye IgG completa, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos que incluyen la región de unión completa del receptor FcRn. La región de la parte Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito basándose en cristalografía de rayos X (Burmeister y col. 1994, Nature 372:379). La mayor área de contacto de Fc con el FcRn está cerca de la intersección de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos dentro de una única cadena pesada de Ig. Los componentes de unión a FcRn incluyen IgG completas, el fragmento Fc de IgG y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa de FcRn. Los principales sitios de contacto incluyen los residuos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio CH2 y residuos de aminoácidos 385-387, 428 y 433-436 del dominio CH3. Referencias hechas a la numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, o regiones, se basan todos en Kabat y col. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, MD.

La región Fc de IgG puede modificarse según procedimientos bien reconocidos tales como mutagénesis dirigida a sitio y similares dando los fragmentos de IgG o Fc modificados o partes de los mismos que se unirán por FcRn.

Tales modificaciones incluyen modificaciones remotas de los sitios de contacto de FcRn, además de modificaciones dentro de los sitios de contacto que preservan o incluso potencian la unión al FcRn. Por ejemplo, los siguientes residuos de aminoácidos individuales en Fc de IgG1 humana (Fc γ 1) pueden estar sustituidos sin pérdida significativa de afinidad de unión de Fc por FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301 A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M368A, T359A, K360A, N361A, Q302A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q498A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A y K447A, en los que, por ejemplo, P238A representa prolina no mutante sustituida con alanina en la posición número 238. Como un ejemplo, un caso específico de la presente descripción, por ejemplo, una realización específica de la presente invención, incorpora la mutación N297A, que elimina un sitio de N-glucosilación altamente conservado. Además de alanina, otros aminoácidos pueden estar sustituidos con los aminoácidos no altamente en las posiciones especificadas anteriormente. Las mutaciones pueden introducirse individualmente en Fc dando lugar a más de cien componentes de unión a FcRn distintos de Fc nativo. Adicionalmente, las combinaciones de dos, tres o más de estas mutaciones individuales pueden introducirse juntas, dando lugar a cientos de componentes de unión a FcRn. Además, uno de los componentes de unión a FcRn del híbrido de monómero-dímero puede mutarse y el otro componente de unión a FcRn no mutarse en absoluto, o ambos pueden mutarse, pero con diferentes mutaciones. Cualquiera de las mutaciones descritas en la presente memoria, que incluyen N297A, puede usarse para modificar Fc, independientemente de la molécula biológicamente activa (por ejemplo, EPO, IFN, factor IX, T20).

Ciertas de las mutaciones anteriores pueden conferir nueva funcionalidad tras la unión de FcRn al componente. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, eliminando un sitio de N-glucosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es para reducir inmunogenicidad, potenciando así la semivida en circulación del componente de unión a FcRn y para hacer que el componente de unión a FcRn sea incapaz de unirse a Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIIA, sin comprometer la afinidad por FcRn (Routledge y col. 1995, *Transplantation* 60:847; Friend y col. 1999, *Transplantation* 68:1632; Shields y col. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591). Como otro ejemplo de la nueva funcionalidad que se produce a partir de las mutaciones descritas anteriormente, la afinidad por FcRn puede aumentarse más allá de la del no mutante en algunos casos. Esta elevada afinidad puede reflejar una constante de asociación elevada, una constante de disociación reducida, o ambos, una constante de asociación elevada y una constante de disociación reducida. Se cree que las mutaciones que confieren una elevada afinidad por FcRn incluyen T256A, T307A, E380A y N434A (Shields y col. 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591).

Adicionalmente, al menos tres receptores gamma de Fc humanos parecen reconocer un sitio de unión sobre IgG dentro de la región bisagra inferior, generalmente los aminoácidos 234-237. Por tanto, otro ejemplo de nueva funcionalidad y posible inmunogenicidad reducida puede producirse a partir de mutaciones de esta región, como por ejemplo reemplazando los aminoácidos 233-236 de la IgG1 humana "ELLG" con la secuencia correspondiente de IgG2 "PVA" (con una delección de aminoácido). Se ha mostrado que Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, que median en diversas funciones efectoras, no se unirán a IgG1 cuando tales mutaciones se hayan introducido. Ward y Ghelfie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 y Armour y col., 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613.

En un caso, por ejemplo, en una realización, el componente de unión a FcRn es un polipéptido que incluye la secuencia PKNSSMISNTP (SEQ ID N°: 26) y opcionalmente adicionalmente que incluye una secuencia seleccionada de HQSLGTQ (SEQ ID N°: 27), HQNLSDGK (SEQ ID N°: 28), HQNISDGK (SEQ ID N°: 29) o VISSHLGQ (SEQ ID N°: 30) (patente de EE.UU. 5.739.277).

Dos receptores FcRn pueden unirse a una única molécula de Fc. Datos cristalográficos sugieren que cada molécula de FcRn se une a un polipéptido único del homodímero de Fc. En un caso de la presente descripción, por ejemplo, en una realización de la presente invención, la unión del componente de unión a FcRn, por ejemplo, un fragmento Fc de una IgG, a una molécula biológicamente activa (que en el caso de la invención es una citocina, una hormona o un factor de coagulación) proporciona un medio de administración de la molécula biológicamente activa por vía oral, bucalmente, sublingualmente, rectalmente, vaginalmente, como un aerosol administrado nasalmente o mediante una vía pulmonar, o mediante una vía ocular. En otro caso, por ejemplo, en otra realización, la proteína quimérica puede administrarse invasivamente, por ejemplo, subcutáneamente, intravenosamente.

El experto entenderá que las partes de una región constante de inmunoglobulina para su uso en la proteína quimérica de la invención pueden incluir mutantes o análogos de los mismos, o pueden incluir regiones constantes de inmunoglobulina químicamente modificadas (por ejemplo, PEGiladas), o fragmentos de las mismas (véase, por ejemplo, Aslam y Dent 1998, *Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences* Macmillan Reference, Londres). En un caso, un mutante puede proporcionar unión potenciada de un componente de unión a FcRn para FcRn. También contemplados para su uso en la proteína quimérica de la presente descripción son peptidomiméticos de al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un peptidomimético de un fragmento Fc o un peptidomimético de un componente de unión a FcRn. En un caso, el peptidomimético se identifica usando expresión en fagos o mediante cribado de bibliotecas químicas (véase, por

ejemplo, McCafferty y col. 1990, Nature 348:552, Kang y col. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363; documento EP 0 589 877 B1).

3. Ligantes opcionales

5 La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede comprender opcionalmente al menos una molécula de ligante. El ligante puede comprender cualquier molécula orgánica. En un caso de la presente descripción, por ejemplo, en una realización de la presente invención, el ligante es polietilenglicol (PEG). En otro caso, por ejemplo, en otra realización, el ligante comprende aminoácidos. El ligante puede comprender 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos. En un caso, por ejemplo, en una realización, el ligante es el ligante de ocho aminoácidos EFAGAAAV (SEQ ID N°: 31). Cualquiera de los ligantes descritos en la presente memoria puede usarse en la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, en las proteínas quiméricas de la presente invención, por ejemplo, un híbrido de monómero-dímero, que incluye EFAGAAAV, independientemente de la molécula biológicamente activa (por ejemplo, EPO, IFN, factor IX).

15 El ligante puede comprender la secuencia G_n . El ligante puede comprender la secuencia $(GA)_n$ (SEQ ID N°: 32). El ligante puede comprender la secuencia $(GGS)_n$ (SEQ ID N°: 33). El ligante puede comprender la secuencia $(GGS)_n(GGGG)_n$ (SEQ ID N°: 34). En estos casos, n puede ser un número entero de 1-10, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Ejemplos de ligantes incluyen, pero no se limitan a, GGG (SEQ ID N°: 35), SGGSGGS (SEQ ID N°: 36), GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID N°: 37), GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID N°: 38), GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID N°: 39). El ligante no elimina o disminuye la actividad biológica de la proteína quimérica. Opcionalmente, el ligante potencia la actividad biológica de la proteína quimérica, por ejemplo, disminuyendo más los efectos de impedimento estérico y haciendo la molécula biológicamente activa más accesible a su sitio de unión diana.

25 En un caso específico de la presente descripción, por ejemplo en una realización específica de la presente invención, el ligante para interferón α tiene 15-25 aminoácidos de longitud. En otro caso específico / en otra realización específica, el ligante para interferón α tiene 15-20 aminoácidos de longitud. En otro caso específico / en otra realización específica, el ligante para interferón α tiene 10-25 aminoácidos de longitud. En otro caso específico / en otra realización específica, el ligante para interferón α tiene 15 aminoácidos de longitud. En un caso / en una realización, el ligante para interferón α es $(GGGS)_n$ (SEQ ID N°: 40) en la que G representa glicina, S representa serina y n es un número entero de 1-10. En un caso específico / en una realización específica, n es 3.

30 El ligante también puede incorporar un resto que puede escindirse tanto químicamente (por ejemplo, hidrólisis de un éster enlace), enzimáticamente (es decir, incorporación de una secuencia de escisión de proteasa) como fotolíticamente (por ejemplo, un cromóforo tal como ácido 3-amino-3-(2-nitrofenil)propiónico (ANP)) con el fin de liberar la molécula biológicamente activa de la proteína Fc.

4. Dimerización de proteínas quiméricas usando componentes de unión específicos

35 En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende una primera cadena de polipéptidos que comprende al menos un primer dominio, teniendo dicho primer dominio al menos un componente de unión específico, y una segunda cadena de polipéptidos que comprende al menos un segundo dominio, en la que dicho segundo dominio es un componente de unión específico de dicho primer dominio. Así, la proteína quimérica comprende un polipéptido que puede dimerizarse con otro polipéptido debido a la interacción del primer dominio y el segundo dominio. Los procedimientos de dimerización de anticuerpos usando dominios heterólogos se conocen en la técnica (patentes de EE.UU.: 6.807.706 y 5.910.573; Kostelny y col. 1992, J. Immunol. 148(5):1547).

45 La dimerización puede producirse por formación de un enlace covalente, o alternativamente un enlace no covalente, por ejemplo, interacción hidrofoba, fuerzas de van der Waals, interdigitación de péptidos anfífilos tales como, pero no se limitan a, hélices alfa, interacciones carga-carga de aminoácidos que llevan cargas opuestas tales como, pero no se limitan a, lisina y ácido aspártico, arginina y ácido glutámico. En un caso, el dominio es un haz de hélices que comprende una hélice, un giro y otra hélice. En otro caso, el dominio es una cremallera de leucina que comprende un péptido que tiene varios aminoácidos de repetición en los que cada séptimo aminoácido es un residuo de leucina. En un caso, los componentes de unión específicos son fos/jun (véase Branden y col. 1991, Introduction To Protein Structure, Garland Publishing, Nueva York).

50 En otro caso, la unión está mediada por un enlace químico (véase, por ejemplo, Brennan y col. 1985, Science 229:81). En este caso, inmunoglobulinas intactas, o proteínas quiméricas que comprenden al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, se escinden para generar fragmentos de la cadena pesada. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditiolos vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de TNB se reconvierte entonces en el fragmento de la cadena pesada tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y entonces se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de TNB para formar un dímero quimérico.

D. Ácidos nucleicos

La presente descripción se refiere a una primera construcción de ácidos nucleicos y una segunda construcción de ácidos nucleicos comprendiendo cada una una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una parte de la proteína quimérica de la presente descripción. En un caso, la primera construcción de ácidos nucleicos comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una parte de una región constante de inmunoglobulina operativamente ligada a una segunda secuencia de ADN que codifica una molécula biológicamente activa, y dicha segunda construcción de ADN comprende una secuencia de ADN que codifica una región constante de inmunoglobulina sin la segunda secuencia de ADN que codifica una molécula biológicamente activa.

La molécula biológicamente activa puede incluir, por ejemplo, pero no como limitación, un inhibidor de la fusión viral, un factor de coagulación, un factor de crecimiento u hormona, o un receptor, o análogo, o fragmento de cualquiera de los precedentes. Las secuencias de ácidos nucleicos también pueden incluir secuencias adicionales o elementos conocidos en la técnica (por ejemplo, promotores, potenciadores, secuencias de poli A, marcas de afinidad). En un caso, la secuencia de ácidos nucleicos de la primera construcción puede incluir opcionalmente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un ligante situado entre la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la molécula biológicamente activa y la parte de la región constante de inmunoglobulina. La secuencia de ácidos nucleicos de la primera construcción de ADN puede incluir opcionalmente una secuencia de ligante dispuesta antes o después de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la molécula biológicamente activa y/o la parte de la región constante de inmunoglobulina.

En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende ADN. En otro caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende ARN. La construcción de ácidos nucleicos puede ser un vector, por ejemplo, un vector viral o un plásmido. Ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado o un vector de virus de la leucemia murina. Ejemplos de plásmidos incluyen, pero no se limitan a, pUC, pGEM y pGEX.

En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 3a (SEQ ID N°: 7). En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 3b (SEQ ID N°: 9). En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 3c (SEQ ID N°: 11). En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 3d (SEQ ID N°: 13). En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 3e (SEQ ID N°: 15). En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 3f (SEQ ID N°: 17). En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 3g (SEQ ID N°: 19). En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 3h (SEQ ID N°: 21). En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 3i (SEQ ID N°: 23). En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 3j (SEQ ID N°: 25). En un caso, la construcción de ácidos nucleicos comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 17a (SEQ ID N°: 27).

Debido a la degeneración conocida del código genético, en la que más de un codón puede codificar el mismo aminoácido, una secuencia de ADN puede variar de la mostrada en SEQ ID N°: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 ó 27 y todavía codificar un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID N°: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ó 26 respectivamente. Tales secuencias de ADN de variante pueden resultar de mutaciones silenciosas (por ejemplo, que se producen durante amplificación por PCR), o pueden ser el producto de mutagénesis deliberada de una secuencia nativa. Así, la presente descripción proporciona secuencias de ADN aisladas que codifican polipéptidos de la presente descripción, elegidas de: (a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 ó 27; (b) ADN que codifica los polipéptidos de SEQ ID N°: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ó 26; (c) ADN que puede hibridarse con un ADN de (a) o (b) en condiciones de rigurosidad moderada y que codifica polipéptidos de la presente descripción; (d) ADN que puede hibridarse con un ADN de (a) o (b) en condiciones de alta rigurosidad y que codifica polipéptidos de la presente descripción, y (e) ADN que se degenera como resultado del código genético a un ADN definido en (a), (b), (c), o (d) y que codifica polipéptidos de la presente descripción. Por supuesto, los polipéptidos codificados por tales secuencias de ADN están englobados por la presente descripción.

En otro caso, las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica la proteína quimérica de la presente descripción también pueden comprender secuencias de nucleótidos que son al menos el 80% idénticas a una secuencia nativa. También se contemplan casos en los que moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica la proteína quimérica de la presente descripción comprende una secuencia que es al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 98% idéntica, al menos el 99% idéntica, o al menos el 99,9% idéntica a una secuencia nativa. Una secuencia nativa puede incluir cualquier secuencia de ADN no alterada por la mano humana. La identidad en porcentaje puede determinarse por inspección visual y cálculo matemático. Alternativamente, la identidad en porcentaje de dos secuencias de ácidos nucleicos puede determinarse comparando información de secuencias usando el programa informático GAP, versión 6.0, descrito por Devereux y col. 1984, Nucl. Acids Res. 12:387, y disponible de la Universidad de Wisconsin, Genetics Computer Group (UWCG). Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de

comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) para nucleótidos y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess 1986, Nucl. Acids Res. 14:6745, como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds. 1979, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pág. 353-358; (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y un penalización de 0,10 adicional para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos terminales. También pueden usarse otros programas usados por un experto en la materia de comparación de secuencias. En base a la descripción anterior, y a la descripción contenida en cualquier lugar de la presente memoria, la presente invención proporciona primer y segundo polinucleótidos como se ha establecido en las reivindicaciones anejas.

E. Síntesis de proteínas quiméricas

- 10 Las proteínas quiméricas que comprenden al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y una molécula biológicamente activa pueden sintetizarse usando técnicas muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, las proteínas quiméricas de la presente descripción, que incluyen las proteínas quiméricas de la presente invención, pueden sintetizarse recombinantemente en células (véase, por ejemplo, Sambrook y col. 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. y Ausubel y col. 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.). Alternativamente, las proteínas quiméricas de la presente descripción, que incluyen las proteínas quiméricas de la presente invención, pueden sintetizarse usando procedimientos sintéticos conocidos tales como síntesis en fase sólida. Las técnicas sintéticas son muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Merrifield, 1973, Chemical Polypeptides (Katsoyannis y Panayotis eds.) pág. 335-61; Merrifield 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Davis y col. 1985, Biochem Intl. 10:394; Finn y col. 1976, The Proteins (3^a ed.) 2:105; Erikson y col. 1976, The Proteins (3^a ed.) 2:257; patente de EE.UU. 3.941.763). Alternativamente, las proteínas quiméricas de la presente descripción, que incluyen las proteínas quiméricas de la presente invención, pueden sintetizarse usando una combinación de procedimientos recombinantes y sintéticos. En ciertas aplicaciones puede ser beneficioso usar tanto un procedimiento recombinante como una combinación de procedimientos recombinantes y sintéticos.
- 25 Los ácidos nucleicos que codifican una molécula biológicamente activa pueden sintetizarse fácilmente usando técnicas recombinantes muy conocidas en la técnica. Alternativamente, los propios péptidos pueden sintetizarse químicamente. Los ácidos nucleicos de la presente descripción, que incluyen los ácidos nucleicos de la presente invención, pueden sintetizarse mediante procedimientos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, por el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como están comercialmente disponibles de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, oligonucleótidos de fosforotioato pueden sintetizarse mediante el procedimiento de Stein y col. 1988, Nucl. Acids Res. 16:3209, oligonucleótidos de metilfosfonato pueden prepararse por uso de soportes de polímero de vidrio de poro controlado como se describen en Sarin y col. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7448. Se conocen procedimientos adicionales de síntesis de ácidos nucleicos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.015.881; 6.281.331; 6.469.136).
- 35 Las secuencias de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina, o fragmentos de las mismas, pueden clonarse a partir de una variedad de bibliotecas de ADN genómico o ADNc conocidas en la técnica. Las técnicas para aislar tales secuencias de ADN usando procedimientos basados en sondas son técnicas convencionales y son muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Las sondas para aislar tales secuencias de ADN pueden basarse en secuencias de ADN publicadas (véase, por ejemplo, Hieter y col. 1980, Cell 22:197-207). Puede usarse el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desvelado por Mullis y col. (patente de EE.UU. 4.683.195) y Mullis (patente de EE.UU. 4.683.202). La elección de biblioteca y la selección de sondas para el aislamiento de tales secuencias de ADN está dentro del nivel del experto habitual en la materia. Alternativamente, las secuencias de ADN que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas pueden obtenerse de vectores conocidos en la técnica que contienen inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas.
- 45 Para la producción recombinante, una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una parte de la proteína quimérica de la presente descripción por ejemplo, de la proteína quimérica de la presente invención, (por ejemplo una parte de una región constante de inmunoglobulina) y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una parte de la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, de la proteína quimérica de la presente invención (por ejemplo, una parte de una región constante de inmunoglobulina y una molécula biológicamente activa, que en el caso de la presente invención es una citocina, una hormona, o un factor de coagulación) se insertan en vehículos de expresión apropiados, es decir, vectores que contienen los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada, o en el caso de un vector viral de ARN, los elementos necesarios para la replicación y traducción. Los ácidos nucleicos que codifican la proteína quimérica se insertan en el vector en la pauta de lectura apropiada.
- 50
- 55 Los vehículos de expresión se transfectan o co-transfectan entonces en una célula diana adecuada, que expresará los polipéptidos. Técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a, precipitación con fosfato de calcio (Wigler y col. 1978, Cell 14:725) y electroporación (Neumann y col. 1982, EMBO, J. 1:841), y reactivos basados en liposomas. Puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión en huésped para expresar las proteínas quiméricas descritas en la presente memoria que incluyen tanto células procariontas como eucariotas. Éstas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago o ADN de plásmido recombinantes que contienen
- 60

una secuencia codificante apropiada; levadura u hongos filamentosos transformados con vectores de expresión de levadura u hongos recombinantes que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células de insecto infectados por vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células de planta infectados por vectores de expresión en virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco) o transformados con vector de expresión en plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contiene una secuencia codificante apropiada; o sistemas de células de animal, que incluyen células de mamífero (por ejemplo, células CHO, Cos, HeLa).

Si la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, se sintetiza recombinantemente en una célula procariota, puede desearse replegar la proteína quimérica. La proteína quimérica producida por este procedimiento puede replegarse a una conformación biológicamente activa usando condiciones conocidas en la técnica, por ejemplo, desnaturalizando bajo condiciones reductoras y luego dializando lentamente en PBS.

Dependiendo del sistema de expresión usado, la proteína quimérica expresada se aísla entonces mediante procedimientos bien establecidos en la materia (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico).

Los vectores de expresión pueden codificar marcas que permiten la fácil purificación de la proteína quimérica recombinantemente producida. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vector pUR278 (Ruther y col. 1983, EMBO J. 2:1791) en el que la proteína quimérica descrita en la presente memoria que codifica secuencias puede ligarse en el vector en marco con la región codificante de lac z de manera que se produzca una proteína híbrida; pueden usarse vectores pGEX para expresar proteínas quiméricas de la presente descripción, por ejemplo, proteínas quiméricas de la presente invención, con una marca de glutatión S-transferasa (GST). Estas proteínas son normalmente solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células por adsorción a perlas de glutatión-agarosa, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores incluyen sitios de escisión (trombina o la proteasa factor Xa o PreScission Protease™ (Pharmacia, Peapack, N.J.)) para la fácil eliminación de la marca después de la purificación.

Para aumentar la eficiencia de producción, los polinucleótidos pueden diseñarse para codificar múltiples unidades de la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, de la proteína quimérica de la presente invención, separada por sitios de escisión enzimática. El polipéptido resultante puede escindirse (por ejemplo, mediante tratamiento con la enzima apropiada) con el fin de recuperar las unidades de polipéptido. Esto puede aumentar el rendimiento de polipéptidos accionados por un único promotor. Cuando se usa en sistemas de expresión virales apropiados, la traducción de cada polipéptido codificado por el ARNm se dirige internamente en el transcrito; por ejemplo, por un sitio interno de entrada al ribosoma, IRES. Así, la construcción policistrónica dirige la transcripción de un único ARNm policistrónico grande que, a su vez, dirige la traducción de múltiples polipéptidos individuales. Este enfoque elimina la producción y procesamiento enzimático de poliproteínas y puede aumentar significativamente el rendimiento de polipéptido accionado por un único promotor.

Los vectores usados en la transformación contendrán normalmente un marcador de selección usado para identificar transformantes. En sistemas bacterianos, esto puede incluir un gen de resistencia a antibióticos tales como ampicilina o kanamicina. Los marcadores de selección para su uso en células de mamífero cultivadas incluyen genes que confieren resistencia a fármacos, tales como neomicina, higromicina y metrotrexato. El marcador de selección puede ser un marcador de selección amplificable. Un marcador de selección amplificable es el gen DHFR. Otro marcador amplificable es el ADNc de DHFR (Simonsen y Levinson 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495). Los marcadores de selección se revisan por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA) y la elección de marcadores de selección está perfectamente dentro del nivel del experto habitual en la materia.

Los marcadores de selección pueden introducirse en la célula sobre un plásmido separado al mismo tiempo que el gen de interés, o pueden introducirse sobre el mismo plásmido. Si es sobre el mismo plásmido, el marcador de selección y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, produciendo la última disposición un mensaje dicistrónico. Las construcciones de este tipo se conocen en la técnica (por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.713.339).

Los elementos de expresión de los sistemas de expresión varían en su concentración y especificidades. Dependiendo del sistema huésped/vector utilizado, pueden usarse distintos elementos de transcripción y traducción adecuados, que incluyen promotores constitutivos e inducibles, en el vector de expresión. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos pueden usarse promotores inducibles tales como pL de bacteriófago A, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido de ptrp-lac) y similares; cuando se clona en sistemas de células de insecto, pueden usarse promotores tales como el promotor poliédrico del baculovirus; cuando se clona en sistemas de célula de planta, pueden usarse promotores derivados del genoma de células vegetales (por ejemplo, promotores de choque térmico; el promotor para la subunidad pequeña de RUBISCO; el promotor para la proteína de unión a clorofila a/b) o de virus de plantas (por ejemplo, el promotor de 35S ARN de CaMV; el promotor de la proteína de la envuelta de TMV); cuando se clona en sistemas de células de mamífero, pueden usarse promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor de 7,5 K del virus de la variolovacuna); cuando se generan líneas celulares que contienen

múltiples copias de producto de expresión, pueden usarse vectores basados en SV40, BPV y EBV con un marcador de selección apropiado.

5 En casos en los que se usen vectores de expresión en plantas, la expresión de secuencias que codifican formas cicladas lineales o no cicladas de las proteínas quiméricas de la presente descripción, que incluyen las proteínas quiméricas de la presente invención, puede accionarse por distintos promotores. Por ejemplo, pueden usarse promotores virales tales como los promotores 35S ARN y 19S ARN de CaMV (Brisson y col. 1984, Nature 310:511-514), o el promotor de la proteína de la envuelta de TMV (Takamatsu y col. 1987, EMBO J. 6:307-311);
10 alternativamente, pueden usarse promotores de planta tales como la subunidad pequeña de RUBISCO (Coruzzi y col. 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie y col. 1984, Science 224:838-843) o promotores de choque térmico, por ejemplo, hsp17.5-E o hsp17.3-B de soja (Gurley y col. 1986, Mol. Cell. Biol. 6:559-565). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales usando plásmidos Ti, plásmidos RI, vectores de virus de planta, transformación de ADN directa, microinyección, electroporación, etc., para revisiones de tales técnicas véase, por ejemplo, Weissbach & Weissbach 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, pág. 421-463; y Grlerson & Corey 1988, Plant Molecular Biology, 2ª ed., Blackie, Londres, Cap. 7-9.

15 En un sistema de expresión en insecto que puede usarse para producir las proteínas quiméricas de la presente descripción, que incluyen las proteínas quiméricas de la presente invención, el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como vector para expresar los genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Una secuencia codificante puede clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen poliédrico) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor poliédrico).
20 La inserción satisfactoria de una secuencia codificante producirá la inactivación del gen poliédrico y la producción de virus recombinante no ocluido (es decir, virus que carece de la cubierta proteinácea codificada por el gen poliédrico). Estos virus recombinantes se usan entonces para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado (véase, por ejemplo, Smith y col. 1983, J. Virol. 46:584; patente de EE.UU. 4.215.051). Otros ejemplos de este sistema de expresión puede encontrarse en Ausubel y col., eds. 1989, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

Otro sistema que puede usarse para expresar las proteínas quiméricas de la presente descripción, que incluyen las proteínas quiméricas de la presente invención, es el sistema de expresión en gen glutamina sintetasa, también denominado el "sistema de expresión en GS" (Lonza Biologics PLC, Berkshire, RU). Este sistema de expresión se describe en detalle en la patente de EE.UU. 5.981.216.

30 En células huésped de mamífero pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que un adenovirus se use como vector de expresión, una secuencia codificante puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico puede entonces insertarse en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y que puede expresar el péptido en huéspedes infectados (véase, por ejemplo, Logan & Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655). Alternativamente puede usarse el promotor de la variolovacuna 7.5 K (véase, por ejemplo, Mackett y col. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415; Mackett y col. 1984, J. Virol, 49:857; Panicali y col. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4927).

40 En casos en los que un adenovirus se use como vector de expresión, una secuencia codificante puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico puede entonces insertarse en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y que puede expresar el péptido en huéspedes infectados (véase, por ejemplo, Logan & Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655). Alternativamente puede usarse el promotor de la variolovacuna 7.5 K (véase, por ejemplo, Mackett y col. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415; Mackett y col. 1984, J. Virol. 49:857; Panicali y col. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4927).

45 Las células huésped que contienen construcciones de ADN de la proteína quimérica se cultivan en un medio de crecimiento apropiado. Como se usa en la presente memoria, el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene nutrientes requeridos para el crecimiento de células. Los nutrientes requeridos para el crecimiento celular pueden incluir una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y factores de crecimiento. Opcionalmente, los medios pueden contener suero bovino o suero bovino fetal. En un caso, por ejemplo, en una realización, los medios no contienen sustancialmente IgG. El medio de crecimiento seleccionará generalmente células que contienen la construcción de ADN por, por ejemplo, selección de fármaco o deficiencia en un nutriente esencial que es complementado por el marcador de selección sobre la
50 construcción de ADN o co-transfectado con la construcción de ADN. Células de mamífero cultivadas se cultivan generalmente en medios que contienen suero o libres de suero comercialmente disponibles (por ejemplo, MEM, DMEM). La selección de un medio apropiado para la línea celular particular usada está dentro del nivel del experto habitual en la materia.

60 La proteína quimérica recombinantemente producida de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica recombinantemente producida de la presente invención, puede aislarse de los medios de cultivo. El medio de cultivo

de células huésped transformadas o transfectadas apropiadamente cultivadas se separa del material celular, y se demuestra la presencia de proteínas quiméricas. Un procedimiento de detección de las proteínas quiméricas, por ejemplo, es por la unión de las proteínas quiméricas o partes de las proteínas quiméricas a un anticuerpo específico que reconoce la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención. Un anticuerpo anti-proteína quimérica puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal producido contra la proteína quimérica en cuestión. Por ejemplo, la proteína quimérica contiene al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina. Los anticuerpos que reconocen la región constante de muchas inmunoglobulinas se conocen en la técnica y están comercialmente disponibles. Un anticuerpo puede usarse para realizar un ELISA o una transferencia Western para detectar la presencia de la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención.

La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede sintetizarse en un animal transgénico, tal como un roedor, vaca, cerdo, oveja o cabra. El término "animales transgénicos" se refiere a animales no humanos que han incorporado un gen extraño en su genoma. Debido a que este gen está presente en tejidos de la línea germinal, se pasa de padres a hijos. Los genes exógenos se introducen en embriones unicelulares (Brinster y col. 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438). Los procedimientos de producción de animales transgénicos se conocen en la técnica, que incluyen transgénicos que producen moléculas de inmunoglobulina (Wagner y col. 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6376; McKnight y col. 1983, Cell 34:335; Brinster y col. 1983, Nature 306:332; Ritchie y col. 1984, Nature 312:517; Baldassarre y col. 2003, Theriogenology 59:831; Robl y col. 2003, Theriogenology 59:107; Malassagne y col. 2003, Xenotrasplantation 10(3):267).

La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, también puede producirse por una combinación de técnicas de química sintética y recombinantes. Por ejemplo, la parte de una región constante de inmunoglobulina puede expresarse recombinantemente como se ha descrito anteriormente. La molécula biológicamente activa, que en el caso de la presente invención es una citocina, una hormona, o un factor de coagulación, puede producirse usando técnicas de síntesis química conocidas (por ejemplo, síntesis en fase sólida).

La parte de una región constante de inmunoglobulina puede ligarse a la molécula biológicamente activa usando química de ligación apropiada y luego combinarse con una parte de una región constante de inmunoglobulina que no se ha ligado a una molécula biológicamente activa para formar la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención. En un caso de esta descripción, la parte de una región constante de inmunoglobulina es un fragmento Fc. El fragmento Fc puede producirse recombinantemente para formar Cys-Fc y hacerse reaccionar con una molécula biológicamente activa que expresa un tioéster para hacer un híbrido de monómero-dímero. En otro caso se prepara un Fc-tioéster y se hace reaccionar con una molécula biológicamente activa que expresa una cisteína del extremo N (Figura 4).

En un caso, la parte de una región constante de inmunoglobulina ligada a la molécula biológicamente activa formará homodímeros. Los homodímeros pueden alterarse exponiendo los homodímeros a condiciones desnaturalizantes y reductoras (por ejemplo, beta-mercaptoetanol y urea 8 M) y luego combinarse posteriormente con una parte de una región constante de inmunoglobulina no ligada a una molécula biológicamente activa para formar híbridos de monómero-dímero. Los híbridos de monómero-dímero se desnaturalizan entonces y se repliegan dializando en PBS y se aíslan, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño o de afinidad.

En otro caso, la parte de una región constante de inmunoglobulina formará homodímeros antes de ligarse a la molécula biológicamente activa. En este caso, condiciones de reacción para ligar la molécula biológicamente activa al homodímero pueden ajustarse de forma que se favorezca el enlace de la molécula biológicamente activa a solo una cadena del homodímero (por ejemplo, ajustando los equivalentes molares de cada reactante).

La molécula biológicamente activa puede sintetizarse químicamente con una cisteína del extremo N. La secuencia que codifica una parte de una región constante de inmunoglobulina puede subclonarse en un vector que codifica inteína ligada a un dominio de unión a quitina (New England Biolabs, Beverly, MA). La inteína puede ligarse al extremo C de la parte de una región constante de inmunoglobulina. En un caso, la parte de la inmunoglobulina con la inteína ligada a su extremo C puede expresarse en una célula procarionota. En otro caso, la parte de la inmunoglobulina con la inteína ligada a su extremo C puede expresarse en una célula eucariota. La parte de región constante de inmunoglobulina ligada a inteína puede hacerse reaccionar con MESNA. En un caso, la parte de una región constante de inmunoglobulina ligada a inteína está unida a una columna, por ejemplo, una columna de quitina y luego se eluye con MESNA. La molécula biológicamente activa y la parte de una inmunoglobulina pueden hacerse reaccionar juntas de forma que se produzca la transposición nucleófila y la molécula biológicamente activa se ligue covalentemente a la parte de una inmunoglobulina mediante un enlace amida (Dawsen y col. 2000, Annu. Rev. Biochem. 69:923). La proteína quimérica sintetizada de esta forma puede incluir opcionalmente un péptido ligante entre la parte de una inmunoglobulina y la molécula biológicamente activa. El ligante puede, por ejemplo, sintetizarse sobre el extremo N de la molécula biológicamente activa. Los ligantes pueden incluir péptidos y/o moléculas orgánicas (por ejemplo, polietilenglicol y/o secuencias de aminoácidos cortas). Esta síntesis recombinante y química combinada permite el rápido cribado de moléculas biológicamente activas y ligantes para optimizar propiedades deseadas de la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo de la proteína quimérica de la presente invención, por ejemplo, inhibición viral, hemostasia, producción de glóbulos rojos, semivida biológica, estabilidad,

unión a proteínas del suero o alguna otra propiedad de la proteína quimérica. El procedimiento también permite la incorporación de aminoácidos no naturales en la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, en la proteína quimérica de la presente invención, que puede ser útil para optimizar una propiedad deseada de la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, de la proteína quimérica de la presente invención. Si se desea, la proteína quimérica producida por este procedimiento puede replegarse a una conformación biológicamente activa usando condiciones conocidas en la técnica, por ejemplo, condiciones reductoras y luego dializarse lentamente en PBS.

Alternativamente, la cisteína del extremo N puede estar sobre la parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento Fc. Un fragmento Fc puede generarse con una cisteína del extremo N aprovechando el hecho de que una Fc nativa tiene una cisteína en la posición 226 (véase Kabat y col. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, MD).

Para exponer una cisteína terminal, un fragmento Fc puede expresarse recombinantemente. En un caso, el fragmento Fc se expresa en una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. La secuencia que codifica la parte de Fc que empieza con Cys 226 (numeración EU) puede colocarse inmediatamente siguiendo a una secuencia que codifica un péptido señal, por ejemplo, OmpA, PhoA, STII. La célula procariota puede someterse a choque osmótico para liberar el fragmento Fc recombinante. En otro caso, el fragmento Fc se produce en una célula eucariota, por ejemplo, una célula CHO, una célula BHK. La secuencia que codifica un péptido señal, por ejemplo, cadena ligera de Igk de ratón o secuencia señal Kb de MHC de clase I, de forma que cuando la proteína quimérica recombinante se sintetice por una célula eucariota, la secuencia señal se escindiría, dejando una cisteína del extremo N que entonces puede aislarse y hacerse reaccionar químicamente con una molécula que lleva un tioéster (por ejemplo, un tioéster en el extremo C si la molécula comprende aminoácidos).

La cisteína del extremo N sobre un fragmento Fc también puede generarse usando una enzima que escinde su sustrato en su extremo N, por ejemplo, factor X^a, enterocinasa, y el producto se aísla y se hace reaccionar con una molécula con un tioéster.

El fragmento Fc recombinantemente expresado puede usarse para preparar homodímeros o híbridos de monómero-dímero.

En un caso específico, un fragmento Fc se expresa con el péptido señal de interferón α humano adyacente a la Cys en la posición 226. Si una construcción que codifica este polipéptido se expresa en células CHO, las células CHO escinden el péptido señal en dos posiciones distintas (en Cys 226 y en Val dentro de 2 aminoácidos del péptido señal en la dirección 5' en la dirección del extremo N). Esto genera una mezcla de dos especies de fragmentos Fc (uno con una Val del extremo N y uno con una Cys del extremo N). Esto produce a su vez una mezcla de especies dimeras (homodímeros con Val del extremo N, homodímeros con Cys terminal y heterodímeros en los que una cadena tiene una Cys terminal y la cadena tiene una Val terminal). Los fragmentos Fc pueden hacerse reaccionar con una molécula biológicamente activa que tiene un tioéster en el extremo C y el híbrido de monómero-dímero resultante puede aislarse de la mezcla (por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño). Se contempla que cuando otras secuencias de péptidos señal se usen para la expresión de fragmentos Fc en células CHO se generará una mezcla de especies de fragmentos Fc con al menos dos extremos N diferentes.

En otro caso, una Cys-Fc recombinantemente producida puede formar un homodímero. El homodímero puede hacerse reaccionar con péptido que tiene un ligante ramificado sobre el extremo C, en el que el ligante ramificado tiene dos tioésteres del extremo C que pueden hacerse reaccionar con el Cys-Fc. En otro caso, por ejemplo en otra realización de la presente invención, la molécula biológicamente activa tiene un único tioéster no terminal que puede hacerse reaccionar con Cys-Fc. Alternativamente, el ligante ramificado puede tener dos cisteínas del extremo C que pueden hacerse reaccionar con un Fc-tioéster. En otro caso, el ligante ramificado tiene dos grupos funcionales que pueden hacerse reaccionar con el Fc-tioéster, por ejemplo, 2-mercaptoamina. La molécula biológicamente activa puede comprender aminoácidos. La molécula biológicamente activa puede incluir una molécula orgánica pequeña o una molécula inorgánica pequeña.

F. Procedimientos de uso de proteínas quiméricas

Las proteínas quiméricas de la presente descripción tienen muchos usos como se reconocerá por un experto en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, procedimientos para tratar un sujeto con una enfermedad o afección. La enfermedad o afección puede incluir, pero no se limita a, una infección viral, un trastorno hemostático, anemia, cáncer, leucemia, una afección inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, artritis, psoriasis, lupus eritematoso, esclerosis múltiple) o una infección bacteriana (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.086.875, 6.030.613, 6.485.726; documentos WO 03/077834; US2003-0235536A1).

1. Procedimientos de tratamiento de un sujeto con una deficiencia de glóbulos rojos

La presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene una deficiencia de glóbulos rojos, por ejemplo, anemia, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una proteína quimérica, en la que la proteína quimérica comprende una primera y una segunda cadena de

polipéptidos, en la que la primera cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y al menos un agente que puede inducir la proliferación de glóbulos rojos, por ejemplo, EPO, y la segunda cadena de polipéptidos comprende al menos una parte de una inmunoglobulina sin el agente que puede inducir la proliferación de glóbulos rojos de la primera cadena.

5 2. Procedimientos de tratamiento de un sujeto con una infección viral

La presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene una infección viral o está expuesto a un virus que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una proteína quimérica, en el que la proteína quimérica comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos, en la que la primera cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y al menos un agente antiviral, por ejemplo, un inhibidor de la fusión o interferón α y la segunda cadena de polipéptidos comprende al menos una parte de una inmunoglobulina sin el agente antiviral de la primera cadena. En un caso, el sujeto se infecta con un virus que puede tratarse con IFN α , por ejemplo, virus de la hepatitis C. En un caso, el sujeto se infecta con VIH, tal como VIH-1 o VIH-2.

En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción inhibe la replicación viral. En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción previene o inhibe la entrada viral en células diana, deteniendo, previniendo o limitando así la propagación de una infección viral en un sujeto y disminuyendo la carga viral en un sujeto infectado. Ligando una parte de una inmunoglobulina al inhibidor de la fusión viral la presente descripción proporciona una proteína quimérica con la actividad inhibidora de la fusión viral con mayor estabilidad y mayor biodisponibilidad en comparación con los inhibidores de la fusión viral solos, por ejemplo, T20, T21, T1249. Así, en un caso, el inhibidor de la fusión viral disminuye o previene la infección por VIH de una célula diana, por ejemplo, VIH-1.

a. Afecciones que pueden tratarse

La proteína quimérica de la presente descripción puede usarse para inhibir o prevenir la infección de una célula diana por un virus de la hepatitis, por ejemplo, virus de la hepatitis C. La proteína quimérica puede comprender un agente antiviral que inhibe la replicación viral.

En un caso, la proteína quimérica de la presente descripción comprende un inhibidor de la fusión. La proteína quimérica de la presente descripción puede usarse para inhibir o prevenir la infección de cualquier célula diana por cualquier virus (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.086.875, 6.030.613, 6.485.726; documentos WO 03/077834; US2003-0235536A1). En un caso, el virus es un virus envuelto tal como, pero no se limita a, VIH, VIS, sarampión, gripe, virus de Epstein-Barr, virus respiratorio sincitial o virus paragripal. En otro caso, el virus es un virus no envuelto tal como rinovirus o virus de la poliomielitis.

La proteína quimérica de la presente descripción puede usarse para tratar un sujeto ya infectado por un virus. El sujeto puede infectarse agudamente con un virus. Alternativamente, el sujeto puede estar crónicamente infectado por un virus. La proteína quimérica de la presente descripción también puede usarse para tratar profilácticamente un sujeto en riesgo de contraer una infección viral, por ejemplo, un sujeto que se sabe o que se cree que está en estrecho contacto con un virus o sujeto que se cree que está infectado o que lleva un virus. La proteína quimérica de la presente descripción puede usarse para tratar un sujeto que puede haberse expuesto a un virus, pero que todavía no se ha diagnosticado positivamente.

En un caso, la presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto infectado por el VHC que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína quimérica, en el que la proteína quimérica comprende un fragmento Fc de una IgG y una citocina, por ejemplo, IFN α .

En un caso, la presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto infectado por el VIH que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína quimérica, en el que la proteína quimérica comprende un fragmento Fc de una IgG y el inhibidor de la fusión viral comprende T20.

3. Procedimientos de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno hemostático

La presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno hemostático que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una proteína quimérica, en el que la proteína quimérica comprende una primera y una segunda cadena, en la que la primera cadena comprende al menos un factor de coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y la segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina.

La proteína quimérica de la presente descripción trata o previene un trastorno hemostático, promoviendo la formación de un coágulo de fibrina. La proteína quimérica de la presente descripción puede activar cualquier miembro de una cascada de coagulación. El factor de coagulación puede ser un participante en la ruta extrínseca, la ruta intrínseca o ambas. En un caso, el factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa. El Factor VIIa puede activar el factor X que interacciona con el Factor Va para escindir protrombina en trombina, que a su vez escinde fibrinógeno en fibrina. En otro caso, el factor de coagulación es Factor IX o Factor IXa. En otro caso más, el factor de coagulación es Factor VIII o Factor VIIIa. En otro caso más, el factor de coagulación es factor de von Willebrand,

Factor XI, Factor XII, Factor V, Factor X o Factor XIII.

a. Afecciones que pueden tratarse

5 La proteína quimérica de la presente descripción puede usarse para tratar cualquier trastorno hemostático. Los trastornos hemostáticos que pueden tratarse por administración de la proteína quimérica de la presente incluyen, pero no se limitan a, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, deficiencia de factor XI (deficiencia de PTA), deficiencia de factor XII, además de deficiencias o anomalías estructurales en fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factor X o factor XIII.

10 En un caso, el trastorno hemostático es un trastorno heredado. En un caso, el sujeto tiene hemofilia A y la proteína quimérica comprende factor VIII o factor VIIIa. En otro caso, el sujeto tiene hemofilia A y la proteína quimérica comprende factor VII o factor VIIa. En otro caso, el sujeto tiene hemofilia B y la proteína quimérica comprende factor IX o factor IXa. En otro caso, el sujeto tiene hemofilia B y la proteína quimérica comprende factor VII o factor VIIa. En otro caso, el sujeto tiene anticuerpos inhibidores para factor VIII o factor VIIIa y la proteína quimérica comprende factor VII o factor VIIa. En otro caso más, el sujeto tiene anticuerpos inhibidores contra factor IX o factor IXa y la proteína quimérica comprende factor VII o factor VIIa.

15 La proteína quimérica de la presente descripción puede usarse para tratar profilácticamente un sujeto con un trastorno hemostático. La proteína quimérica de la presente descripción puede usarse para tratar un episodio hemorrágico agudo en un sujeto con un trastorno hemostático.

20 En un caso, el trastorno hemostático es el resultado de una deficiencia en un factor de coagulación, por ejemplo, factor IX, factor VIII. En otro caso, el trastorno hemostático puede ser el resultado de un factor de coagulación defectivo, por ejemplo, factor de von Willebrand.

En otro caso, el trastorno hemostático puede ser un trastorno adquirido. El trastorno adquirido puede resultar de una enfermedad o afección secundaria subyacente. La afección sin relacionar puede ser, como un ejemplo, pero no como una limitación, cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o embarazo. El trastorno adquirido puede resultar de vejez o de medicación para tratar un trastorno secundario subyacente (por ejemplo, quimioterapia para el cáncer).

25 4. Procedimientos de tratamiento de un sujeto en necesidad de un agente hemostático general

30 La presente descripción también se refiere a procedimientos de tratamiento de un sujeto que no tiene un trastorno hemostático o una enfermedad o afección secundaria que produzca adquisición de un trastorno hemostático. Así, la presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto en necesidad de un agente hemostático general que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una proteína quimérica, en el que la proteína quimérica comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos en la que la primera cadena de polipéptidos comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y al menos un factor de coagulación y la segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin el factor de coagulación de la primera cadena de polipéptidos.

a. Afecciones que pueden tratarse

35 En un caso, el sujeto en necesidad de un agente hemostático general está sometándose a, o va a someterse a, cirugía. La proteína quimérica de la presente descripción puede administrarse antes de o después de cirugía como profiláctico. La proteína quimérica de la presente descripción puede administrarse durante o después de cirugía para controlar un episodio hemorrágico agudo. La cirugía puede incluir, pero no se limita a, trasplante de hígado, resección de hígado o trasplante de citoblastos.

40 La proteína quimérica de la presente descripción puede usarse para tratar un sujeto que tiene un episodio hemorrágico agudo que no tiene un trastorno hemostático. El episodio hemorrágico agudo puede resultar de traumatismo grave, por ejemplo, cirugía, un accidente de automóvil, herida, laceración, disparo de pistola, o cualquier otro evento traumático que produzca sangrado incontrolado.

5. Modalidades de tratamiento

45 La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, una proteína quimérica de la presente invención, puede administrarse intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, o mediante cualquier superficie mucosa, por ejemplo, por vía oral, sublingualmente, bucalmente, sublingualmente, nasalmente, rectalmente, vaginalmente o mediante la vía pulmonar. La proteína quimérica puede implantarse dentro de o ligarse a un soporte sólido de biopolímero que permita la lenta liberación de la proteína quimérica al sitio deseado.

50 La dosis de la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, de la proteína quimérica de la presente invención, variará dependiendo del sujeto y de la vía de administración particular usada. Las dosificaciones pueden oscilar de 0,1 a 100.000 µg/kg de peso corporal. En un caso, el intervalo de dosificación es 0,1-1.000 µg/kg. La proteína puede administrarse continuamente o en intervalos de tiempo específicos. Pueden emplearse ensayos *in vitro* para determinar intervalos de dosis y/o programas óptimos para administración. En la técnica se conocen

muchos ensayos *in vitro* que miden infectividad viral. Por ejemplo, un ensayo con transcriptasa inversa, o un ensayo de rt-PCR o ensayo de ADN ramificado puede usarse para medir concentraciones de VIH. Puede usarse un ensayo StaClot para medir actividad de coagulación. Adicionalmente, dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta obtenidas de modelos animales.

- 5 La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la fusión viral, al menos una parte de una inmunoglobulina y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* por E.W. Martin. Ejemplos de excipientes pueden incluir almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición también puede contener reactivos de tamponamiento del pH y agentes humectantes o emulsionantes.

- 10 Para administración por vía oral, la composición farmacéutica puede tomar la forma de comprimidos o cápsulas preparadas mediante medios convencionales. La composición también puede prepararse como un líquido, por ejemplo, un jarabe o una suspensión. El líquido puede incluir agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (lecitina o goma arábiga), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados) y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden incluir aromatizantes, colorantes y edulcorantes. Alternativamente, la composición puede presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado.

- 15 Para administración bucal y sublingual, la composición pueden tomar la forma de comprimidos, pastillas para chupar o películas de rápida disolución según protocolos convencionales.

- 20 Para administración por inhalación, los compuestos para su uso según la presente descripción se administran convenientemente en forma de un spray en aerosol de un envase presurizado o nebulizador (por ejemplo, en PBS), con un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proveyendo una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y un polvo base adecuado tal como lactosa o almidón.

- 25 La composición farmacéutica puede formularse para administración parenteral (es decir, intravenosa o intramuscular) mediante inyección en bolo. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos.

- 30 La composición farmacéutica también puede formularse para administración rectal como un supositorio o enema de retención, por ejemplo, que contiene bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

6. Terapia de combinación

- 35 La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede usarse para tratar un sujeto con una enfermedad o afección en combinación con al menos otro agente conocido para tratar dicha enfermedad o afección.

- 40 En un caso, la presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto infectado por el VIH que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una proteína quimérica que comprende una primera y una segunda cadena, en la que la primera cadena comprende un inhibidor de la fusión del VIH y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y la segunda cadena comprende al menos una parte de una inmunoglobulina sin un inhibidor de la fusión del VIH de la primera cadena, en combinación con al menos otro agente anti-VIH. Dicho otro agente anti-VIH puede ser cualquier terapéutico con actividad anti-VIH demostrada. Dicho otro agente anti-VIH puede incluir, como un ejemplo, pero no como una limitación, un inhibidor de proteasa (por ejemplo, Amprenavir[®], Crixivan[®], Ritonivir[®]), un análogo de nucleósido de transcriptasa inversa (por ejemplo, AZT, DDI, D4T, 3TC, Ziagen[®]), un inhibidor de análogo de no nucleósido de transcriptasa inversa (por ejemplo, Sustiva[®]), otro inhibidor de la fusión del VIH, un anticuerpo neutralizante específico para el VIH, un anticuerpo específico para CD4, un mimético de CD4, por ejemplo, proteína de fusión CD4-IgG2 (solicitud de patente de EE.UU. 09/912.824) o un anticuerpo específico para CCR5, o CXCR4, o un componente de unión específico de CCR5, o CXCR4.

- 55 En otro caso, la presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto con un trastorno hemostático que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una proteína quimérica que comprende una primera y una segunda cadena, en la que la primera cadena comprende al menos un factor de

coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y la segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin el factor de coagulación de la primera cadena, en combinación con al menos otro factor de coagulación o agente que promueve hemostasia. Dicho otro factor de coagulación o agente que promueve la hemostasia puede ser cualquier terapéutico con actividad de coagulación demostrada. Como un ejemplo, pero no como una limitación, el factor de coagulación o agente hemostático puede incluir factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, protrombina o fibrinógeno, o formas activadas de cualquiera de los precedentes. El factor de coagulación de agente hemostático también puede incluir fármacos antifibrinolíticos, por ejemplo, ácido epsilon-amino-caproico, ácido tranexámico.

7. Procedimientos de inhibición de la fusión viral con una célula diana

La presente descripción también se refiere a un procedimiento *in vitro* para inhibir la fusión del VIH con una célula de mamífero que comprende combinar la célula de mamífero con al menos una proteína quimérica, en la que la proteína quimérica comprende una primera y una segunda cadena, en la que la primera cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y un inhibidor del VIH y la segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin el inhibidor de VIH de la primera cadena. La célula de mamífero puede incluir cualquier célula o línea celular susceptible a infección por el VIH que incluye, pero no se limita a, linfocitos T CD4⁺ humanos primarios o macrófagos, células MOLT-4, células CEM, células AA5 o células HeLa que expresan CD4 sobre la superficie celular.

G. Procedimientos de aislamiento de proteínas quiméricas

Normalmente, cuando las proteínas quiméricas de la presente descripción, que incluyen proteínas quiméricas de la presente invención, se producen, están contenidas en una mezcla de otras moléculas tales como otras proteínas o fragmentos de proteína. Así, la presente descripción proporciona procedimientos de aislamiento de cualquiera de las proteínas quiméricas descritas anteriormente de una mezcla que contiene las proteínas quiméricas. Se ha determinado que las proteínas quiméricas de la presente descripción, que incluyen las proteínas quiméricas de la presente invención, se unen a ligandos colorantes bajo condiciones adecuadas y que la alteración de aquellas condiciones posteriores a la unión pueden alterar el enlace entre el ligando colorante y la proteína quimérica, proporcionándose así un procedimiento de aislamiento de la proteína quimérica. En algunos casos, la mezcla puede comprender un híbrido de monómero-dímero, un dímero y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un Fc. Así, en un caso, la presente descripción proporciona un procedimiento de aislamiento de un híbrido de monómero-dímero. En otro caso, la presente descripción proporciona un procedimiento de aislamiento de dímero.

Por consiguiente, en un caso, la presente descripción proporciona un procedimiento de aislamiento de un híbrido de monómero-dímero de una mezcla, en el que la mezcla comprende

a) el híbrido de monómero-dímero que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en el que la primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y en el que la segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin una molécula biológicamente activa o región variable de inmunoglobulina;

b) un dímero que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en el que la primera y segunda cadenas comprenden ambas una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina; y

c) una parte de una región constante de inmunoglobulina; comprendiendo dicho procedimiento

1) poner en contacto la mezcla con un ligando colorante ligado a un soporte sólido bajo condiciones adecuadas de forma que tanto el híbrido de monómero-dímero como el dímero se unan al ligando colorante;

2) eliminar la parte sin unir de una región constante de inmunoglobulina;

3) alterar las condiciones adecuadas de 1) de forma que se altere la unión entre el híbrido de monómero-dímero y el ligando colorante ligado al soporte sólido;

4) aislar el híbrido de monómero-dímero.

En algunos casos, antes de poner en contacto la mezcla con un ligando colorante, la mezcla puede ponerse en contacto con una sustancia cromatográfica tal como proteína A-Sepharose o similares. La mezcla se eluye de la sustancia cromatográfica usando un tampón de elución apropiado (por ejemplo, un tampón de pH bajo) y el eluato que contiene la mezcla se pone entonces en contacto con el ligando colorante.

Condiciones adecuadas para poner en contacto la mezcla con el ligando colorante pueden incluir un tampón para mantener la mezcla a un pH apropiado. Un pH apropiado puede incluir un pH de 3-10, 4-9, 5-8. En un caso, el pH apropiado es 8,0. Cualquier agente de tamponamiento conocido en la técnica puede usarse mientras que mantenga

el pH en el intervalo apropiado, por ejemplo, tris, HEPES, PIPES, MOPS. Condiciones adecuadas también pueden incluir un tampón de lavado para eluir especies sin unir del ligando colorante. El tampón de lavado puede ser cualquier tampón que no altere la unión de una especie unida. Por ejemplo, el tampón de lavado puede ser el mismo que el tampón usado en la etapa de puesta en contacto.

- 5 Una vez la proteína quimérica se une al ligando colorante, la proteína quimérica se aísla alterando las condiciones adecuadas. Alterar las condiciones adecuadas puede incluir la adición de una sal al tampón. Puede usarse cualquier sal, por ejemplo, NaCl, KCl. La sal debe añadirse a una concentración que sea suficientemente alta para alterar la unión entre el ligando colorante y las especies deseadas, por ejemplo, un híbrido de monómero-dímero.

- 10 En algunos casos en los que la mezcla comprende un Fc, un híbrido de monómero-dímero y un dímero, se ha encontrado que Fc no se une al ligando colorante y así se eluye con el flujo continuo. El dímero se une más estrechamente al ligando colorante que el híbrido de monómero-dímero. Así, se requiere una mayor concentración de sal para alterar el enlace (por ejemplo, eluirlo) entre el dímero y el ligando colorante en comparación con la concentración de sales requerida para alterar el enlace entre el ligando colorante y el híbrido de monómero-dímero.

- 15 En algunos casos puede usarse NaCl para aislar el híbrido de monómero-dímero de la mezcla. En algunos casos, la concentración de sal apropiada que interrumpe el enlace entre el ligando colorante y el híbrido de monómero-dímero es de 200-700 mM, 300-600 mM, 400-500 mM. En un caso, la concentración de NaCl requerida para alterar la unión entre el ligando colorante y el híbrido de monómero-dímero es 400 mM.

- 20 El NaCl también puede usarse para aislar el dímero de la mezcla. Normalmente, el híbrido de monómero-dímero se aísla de la mezcla antes del dímero. El dímero se aísla añadiendo una concentración apropiada de sal al tampón, interrumpiendo así la unión entre el ligando colorante y el dímero. En algunos casos, la concentración apropiada de sal que interrumpe el enlace entre el ligando colorante y el dímero es de 800 mM a 2 M, 900 mM a 1,5 M, 950 mM a 1,2 M. En un caso específico se usa NaCl 1 M para interrumpir la unión entre el ligando colorante y el dímero.

- 25 El ligando colorante puede ser un bio-mimético. Un bio-mimético es una sustancia humanizada, dispositivo o sistema que imita a la naturaleza. Así, en algunos casos, el ligando colorante imita el ligando de una molécula que se produce naturalmente. El ligando colorante puede elegirse de Mimetic Red 1™, Mimetic Red 2™, Mimetic Orange 1™, Mimetic Orange 2™, Mimetic Orange 3™, Mimetic Yellow 1™, Mimetic Yellow 2™, Mimetic Green 1™, Mimetic Blue 1™ y Mimetic Blue 2™ (Prometic Biosciences (EE.UU.) Inc., Wayne, NJ). En un caso específico, el ligando colorante es Mimetic Red 2™ (Prometic Biosciences (EE.UU.) Inc., Wayne, NJ). En ciertos casos, el ligando colorante está ligado a un soporte sólido, por ejemplo, de Mimetic Red 1A6XL™, Mimetic Red 2 A6XL™, Mimetic Orange 1 A6XL™, Mimetic Orange 2 A6XL™, Mimetic Orange 3 A6XL™, Mimetic Yellow 1 A6XL™, Mimetic Yellow 2 A6XL™, Mimetic Green 1 A6XL™, Mimetic Blue 1 A6XL™ y Mimetic Blue 2 A6XL™ (Prometic Biosciences (EE.UU.) Inc., Wayne, NJ).

- 35 El ligando colorante puede ligarse a un soporte sólido. El soporte sólido puede ser cualquier soporte sólido conocido en la técnica (véase, por ejemplo, www.seperationsNOW.com). Ejemplos de soportes sólidos pueden incluir una perla, un gel, una membrana, una nanopartícula o una microesfera. El soporte sólido puede comprender cualquier material que pueda ligarse a un ligando colorante (por ejemplo, agarosa, poliestireno, Sepharose, Sephadex). Los soportes sólidos pueden comprender cualquier polímero orgánico sintético tal como polímeros poliacrílicos, vinílicos, acrilato, polimetacrilato y poliacrilamida. Los soportes sólidos también pueden comprender un polímero de hidrato de carbono, por ejemplo, agarosa, celulosa o dextrano. Los soportes sólidos pueden comprender óxidos inorgánicos tales como sílice, circonia, titania, ceria, alúmina, magnesita (es decir, óxido de magnesio) u óxido de calcio. Los soportes sólidos también pueden comprender combinaciones de algunos de los soportes anteriormente mencionadas que incluyen, pero no se limitan a, dextrano-acrilamida.

Ejemplos

Ejemplo 1: El peso molecular afecta la transcitosis mediada por FcRn

- 45 Se produjeron recombinantemente proteínas quiméricas que comprenden diversas proteínas de interés y Fc de IgG (Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) o en el caso de contactina-Fc, MAB-β-gal (un complejo de un anticuerpo monoclonal unido a β-gal) (Bioscience International, Saco, ME) y MAB-GH (un complejo de anticuerpo monoclonal y hormona de crecimiento) (Research Diagnostics, Inc. Flanders, NJ) se compraron comercialmente. Brevemente, los genes que codifican la proteína de interés se clonaron por PCR y luego se subclonaron en un plásmido de expresión de fusión de Fc. Los plásmidos se transflectaron en células DG44 CHO y se seleccionaron transfectantes estables y se amplificaron con metrotrexato. Los homodímeros de proteína quimérica se purificaron sobre una columna de proteína A. Las proteínas probadas incluyeron interferón α, hormona de crecimiento, eritropoyetina, hormona estimulante del folículo, factor IX, beta-galactosidasa, contactina y factor VIII. La unión de las proteínas a partes de inmunoglobulina, que incluye el componente de unión a receptor FcRn, o el uso de complejos de anticuerpo completo (incluyendo la región de unión a FcRn)-antígeno comercialmente disponibles permitió la investigación de transcitosis en función del peso molecular (véase la patente de EE.UU. 6.030.613). Las proteínas quiméricas se administraron a ratas por vía oral y los niveles en suero se midieron 2-4 horas después de la administración usando un ELISA para proteínas quiméricas

- 5 recombinantemente producidas y tanto una transferencia Western como ELISA para complejos de anticuerpo comercialmente obtenidos y proteínas quiméricas. Adicionalmente, todas las proteínas o complejos comercialmente obtenidos, además de controles de factor VIII-Fc, factor IX-Fc y Epo-Fc, se yodaron usando IODO (Pierce, Pittsburgh, PA). Los resultados indicaron que los niveles de Fc en suero y las proteínas quiméricas de anticuerpos monoclonales administradas por vía oral a ratas se relacionan directamente con el tamaño de la proteína. El punto de corte aparente para las proteínas quiméricas de Fc administradas por vía oral es entre 200-285 kD (Tabla 2).

TABLA 2

Proteína	Tamaño (kD)	Transcitosis
IFN α -Fc	92	++++
GH-Fc	96	+++
Epo-Fc	120	+++
FSH-Fc	170	+++
MAB:GH	172-194	+++
FIX-Fc	200	+
MAB: β Gal	285-420	-
Contactina-Fc	300	-
FVIII Δ -Fc	380	-

Ejemplo 2: Clonación de pcADN 3.1-Flag-Fc

- 10 La secuencia para el péptido FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys), una marca de afinidad común usada para identificar o purificar proteínas, se clonó en el plásmido pcDNA3.1-Fc, que contiene la secuencia señal de Igk de ratón, seguido del fragmento Fc de IgG1 humana (aminoácidos 221-447, numeración EU). La construcción se creó por PCR de solapamiento usando los siguientes cebadores:

FlagFc-F1: 5'- GCTGGCTAGCCACCATGGA -3' (SEQ ID NO:41)

FlagFc-R1: 5'- CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGTCA CCAGTGGAACCTGGAAC -3' (SEQ ID NO:42)

FlagFc-F2: 5'- GACTACAAGG ACGACGATGA CAAGGACAAA ACTCACACAT GCCCACCGTG CCCAGCTCCG GAACTCC -3' (SEQ ID NO:43)

FlagFc-R2: 5'- TAGTGGATCCTCATTACCCG -3' (SEQ ID NO:44)

- 15 El molde de pcDNA3.1-Fc se añadió entonces a dos reacciones de PCR separadas que contenían 50 pmoles cada una de los pares de cebadores Flag-Fc-F1/R1 o Flag-Fc-F2/R2 en una reacción de 50 μ l usando Pfu Ultra ADN polimerasa (Stratagene, CA) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ usando los siguientes ciclos: 95 °C 2 minutos; 30 ciclos de (95 °C 30 segundos, 52 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos), seguido de 72 °C durante 10 minutos. Los productos de estas dos reacciones se mezclaron entonces en otra
20 reacción de PCR (2 μ l cada una) con 50 pmoles de cebadores Flag-Fc-F1 y Flag-Fc-R2 en una reacción de 50 μ l usando Pfu Ultra ADN polimerasa (Stratagene, CA) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ usando los siguientes ciclos: 95 °C 2 minutos; 30 ciclos de (95 °C 30 segundos, 52 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos), seguido de 72 °C durante 10 minutos. El fragmento resultante se purificó en gel, se digirió y se insertó en el plásmido de pcDNA3.1-Fc NheI-Bam HI. El plásmido resultante contiene la secuencia señal de Igk de
25 ratón que produce la proteína Flag-Fc.

Ejemplo 3: Clonación de la construcción de factor VII-Fc

- La secuencia codificante para factor VII se obtuvo por RT-PCR a partir de ARN de hígado fetal humano (Clontech, Palo Alto, CA). La región clonada comprende la secuencia de ADNc de pb 36 a pb 1430 que termina justo antes del codón de terminación. Se introdujo un sitio SbfI en el extremo N. Se introdujo un sitio BspEI en el extremo C. La
30 construcción se clonó por PCR usando los cebadores:

Cadena abajo: 5' GCTACCTGCAGGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGG
3' (SEC ID N°: 45)

Cadena arriba: 5' CAGTTCGGAGCTGGGCACGGCGGGCACGTGTGAGTTT
TGTCGGGAAAT GG 3' (SEC ID N°: 46)

y las siguientes condiciones: 95 °C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto y 45 segundos, y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos.

- 5 El fragmento se digirió con SbfI - BspE I y se insertó en pED.dC-Fc, un plásmido que codifica el fragmento Fc de una IgG1.

Ejemplo 4: Clonación de la construcción de factor IX-Fc

La secuencia codificante de factor IX humano, que incluye la secuencia de prepropeptidos, se obtuvo por amplificación por RT-PCR de ARN de hígado humano adulto usando los siguientes cebadores:

10 natFIX-F: 5'-TTACTGCAGAAGGTTATGCAGCGCGTGAACATG- 3' (SEQ ID N°: 47)

F9-R: 5'-TTTTTCGAATTCAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTTAATCC- 3' (SEQ ID N°: 48)

20 ng de ARN de hígado humano adulto (Clontech, Palo Alto, CA) y 25 pmoles de cada cebador se añadieron a una reacción de RT-PCR usando la RT-PCR de una etapa SuperScript™ con el sistema PLATINUM® Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) según el protocolo del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico MJ usando los
15 siguientes ciclos: 50 °C 30 minutos; 94 °C 2 minutos; 35 ciclos de (94 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 1 minuto) y un final 72 °C 10 minutos. El fragmento se purificó en gel usando el kit de extracción en gel Qiagen (Qiagen, Valencia, CA) y se digirió con PstI-EcoRI, se purificó en gel y se clonó en el digesto correspondiente del plásmido pED.dC.XFc.

Ejemplo 5: Clonación de la construcción de PACE

20 La secuencia codificante para PACE humana (enzima escisora de aminoácidos básicos apareados), una endoproteasa, se obtuvo por RT-PCR. Se usaron los siguientes cebadores:

PACE-F1: 5'- GGTAAGCTTGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGC -3' (SEQ ID N°: 49)

PACE-R1: 5'- GTTTTCAATCTCTAGGACCCACTCGCC -3' (SEQ ID N°: 50)

PACE-F2: 5'- GCCAGGCCACATGACTACTCCGC -3' (SEQ ID N°: 51)

25 PACE-R2: 5'- GGTGAATTCTCACTCAGGCAGGTGTGAGGGCAGC -3' (SEQ ID N°: 52)

El cebador de PACE-F1 añade un sitio HindIII al extremo 5' de la secuencia de PACE que empieza con 3 nucleótidos antes del codón de iniciación, mientras que el cebador de PACE-R2 añade un codón de terminación después del aminoácido 715, que se produce en el extremo del dominio extracelular de PACE, además de añadir un sitio EcoRI al extremo 3' del codón de terminación. Los cebadores de PACE-R1 y -F2 se hibridan en los lados 3' y 5' de un sitio
30 BamHI interno, respectivamente. Entonces se establecieron dos reacciones de RT-PCR usando 25 pmoles de cada uno de los pares de cebadores de PACE-F1/R1 o PACE-F2/R2 con 20 ng de ARN de hígado humano adulto (Clontech; Palo Alto, CA) en una reacción de RT-PCR de 50 µl usando la RT-PCR de una etapa SuperScript™ con sistema PLATINUM® Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) según el protocolo del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico MJ usando los siguientes ciclos: 50 °C 30 minutos; 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30
35 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 2 minutos), seguido de 72 °C 10 minutos. Estos fragmentos se ligaron cada uno en el vector pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) y se secuenciaron completamente. El fragmento de F2-R2 se subclonó entonces en pcDNA6 V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando los sitios BamHI/EcoRI, y entonces el fragmento de F1-R1 se clonó en esta construcción usando los sitios HindIII/BamHI. El plásmido final, pcDNA6-PACE, produce una forma soluble de PACE (aminoácidos 1-715), ya que se ha delecionado la región transmembrana. La secuencia de PACE en pcDNA6-PACE es esencialmente como se describe en Harrison y col.
40 1998, Seminars in Hematology 35:4.

Ejemplo 6: Clonación de la construcción del ligante de ocho aminoácidos de IFN α -Fc

La secuencia codificante de interferón α 2b humano (hIFN α), que incluye la secuencia señal, se obtuvo por PCR a partir de ADN genómico humano usando los siguientes cebadores:

IFN α -Sig-F: 5'-GCTACTGCAGCCACCATGGCCTTGACCTTTGCTTTAC-3'(SEQ ID NO:53)

45 IFN α -EcoR-R: 5'-CGTTGAATTCTTCCTTACTTCTTAACTTTCTTGC-3'(SEQ ID NO:54)

Se preparó ADN genómico a partir de la línea celular de astrocitoma humano 373MG según procedimientos

convencionales (Sambrook y col. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press). Brevemente, aproximadamente 2×10^5 células se sedimentaron por centrifugación, se resuspendieron en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4, luego se mezclaron con un volumen igual de tampón de lisis (Tris 100 mM a pH 8,0/ NaCl 200 mM / 2% de SDS / EDTA 5 mM). Se añadió proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml y la muestra se digirió a 37 °C durante 4 horas con mezcla moderada ocasional. La muestra se extrajo entonces dos veces con fenol:cloroformo, el ADN se precipitó añadiendo acetato sódico a pH 7,0 a 100 mM y un volumen igual de isopropanol, y se sedimentó por centrifugación durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó una vez con 70% de etanol frío y se dejó secar al aire antes de resuspenderlo en TE (Tris 10 mM a pH 8,0 / EDTA mM).

Entonces se usaron 100 ng de este ADN genómico en una reacción de PCR de 25 µl con 25 pmoles de cada cebador usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 50 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos) y finalmente 72 °C 10 minutos. La banda de tamaño esperado (~550 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia, CA), se digirió con PstI/EcoRI, se purificó en gel de nuevo y se clonó en el sitio PstI/EcoRI de pED.dC.XFc, que contiene un ligante de 8 aminoácidos (EFAGAAAV) seguido de la región Fc de IgG1 humana.

Ejemplo 7: Clonación de la construcción del ligante Δ de IFNα-Fc

1 µg de ADN de pED.dC.IFNαFc humano nativo purificado del Ejemplo 6 se usó entonces como molde en una reacción de PCR de 25 µl con 25 pmoles de cada cebador IFNα-Sig-F y el siguiente cebador:

hIFNaNoLinkFc-R: 5'CAGTTCGGAGCTGGGCACGGCGGG
CACGTGTGAGTTTTGTCTTCTTACTTCTTAAACTTTTTGCAAGTTTG- 3'(SEQ ID NO:55)

La reacción de PCR se llevó a cabo usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico RapidCycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) desnaturalizando a 94 °C durante 2 minutos seguido de 18 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 0 segundos, y 72 °C durante 1 minuto con una pendiente de 6, seguido de extensión a 72 °C durante 10 minutos. Un producto de PCR del tamaño correcto (~525 pb) se purificó en gel usando un kit de extracción en gel (Qiagen; Valencia, CA), se digirió con las enzimas de restricción PstI y BspEI, se purificó en gel y se subclonó en los sitios correspondientes de un pED.dC.XFc modificado, en los que los aminoácidos 231-233 de la región Fc se alteraron usando la degeneración del código genético para incorporar un sitio BspEI a la vez que se mantenía la secuencia de aminoácidos no mutante.

Ejemplo 8: Clonación de la construcción del ligante GS15 de IFNα-Fc

Se creó un nuevo vector esqueleto usando el Fc encontrado en la construcción del ligante Δ (que contiene sitios BspEI y RsrII en el extremo 5' usando la degeneración del código genético para mantener la secuencia de aminoácidos), usando este ADN como molde para una reacción de PCR con los siguientes cebadores:

5' B2xGGGGS: 5' gtcaggatccggcgggtggagggagcgcacaaaactcacacgtgcc 3'(SEQ ID NO:56)
3' GGGGS: 5' tgacgcggccgctcatttaccgggagacaggg 3'(SEQ ID NO:57)

Se llevó a cabo una reacción de PCR con 25 pmoles de cada cebador usando la enzima Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ usando el siguiente procedimiento: 95 °C 2 minutos; 30 ciclos de (95 °C 30 segundos, 54 °C 30 segundos, 72 °C 2 minutos), 72 °C 10 minutos. La banda de tamaño esperado (~730 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA), se digirió con BamHI/NotI; se purificó en gel de nuevo y se clonó en el vector digerido con BamHI/NotI de pcDNA6 ID, una versión de pcDNA6 con la secuencia IRES y el gen dhfr insertado en el sitio NotI/XbaI.

Entonces se usaron 500 ng de ADN de pED.dC.IFNαFc humano nativo purificado como molde en una reacción de PCR de 25 µl con los siguientes cebadores:

5' IFNα para GGGGS: 5' ccgctagcctgcaggccacctggcctgacc 3' (SEQ ID N°: 58)

3' IFNα para GGGGS: 5' ccggtaccgcccaccttcttactacgtaaac 3'-(SEQ ID N°: 59)

Se llevó a cabo una reacción de PCR con 25 pmoles de cada cebador usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ usando los siguientes ciclos: 95 °C 2 minutos; 14 ciclos de (94 °C 30 segundos, 48 °C 30 segundos, 72 °C 1 minuto), 72 °C 10 minutos. La banda de tamaño esperado (~600 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA), se digirió con NheI/BamHI, se purificó en gel de nuevo y se clonó en el sitio NheI/BamHI del vector pcDNA6 ID/Fc, anteriormente, para crear una fusión IFNα-Fc con un ligante de Gly/Ser de 10 aminoácidos

(2xGGGGS), pcDNA6 ID/IFN α -GS10-Fc.

Entonces se realizó una reacción de PCR usando 500 ng de este pcDNA6 ID/IFN α -GS10-Fc con los siguientes cebadores

5' B3XGGGGS:5'(SEQ ID NO:60)

5 gtcaggatccggtgaggcggtccggcggtgaggaggagcgacaaaactcacacgtgccc 3' (SEQ ID N°: 61)

fcclv-R: 5' atagaagcctttgaccaggc 3' (SEQ ID N°: 62)

Se llevó a cabo una reacción de PCR con 25 pmoles de cada cebador usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ usando los siguientes ciclos: 95 °C 2 minutos; 14 ciclos de (94 °C 30 segundos, 48 °C 30 segundos, 72 °C 1 minuto), 72 °C 10 minutos. La banda de tamaño esperado (504 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA), se digirió con BamHI/BspEI, la banda de 68 pb se purificó en gel y se clonó en el sitio BamHIBspEI del vector pcDNA6 ID/IFN α -GS10-Fc, anteriormente, para crear una fusión IFN α -Fc con un ligante de Gly/Ser de 15 aminoácidos (3xGGGGS), pcDNA6 ID/IFN α -GS15-Fc.

Ejemplo 9: Clonación de una construcción de péptido básico

15 La región bisagra del fragmento Fc de IgG1 humana del aminoácido 221-229 (numeración EU) se sustituyó con un péptido básico (CCB).

Se usaron cuatro oligonucleótidos solapantes (IDT, Coralville, IA):

1. Sentido 1 de CCB-Fc:

5' GCC GGC GAA TTC GGT GGT GAG TAC CAG GCC CTG AAG AAG AAG GTG
GCC CAG CTG AAG GCC AAG AAC CAG GCC CTG AAG AAG AAG 3' (SEC ID
N°: 63)

20 2. Sentido 2 de CCB-Fc:

5' GTG GCC CAG CTG AAG CAC AAG GGC GGC GGC CCC GCC CCA GAG
CTC CTG GGC GGA CCG A 3'(SEC ID N°: 64)

3. Antisentido 1 de CCB-Fc:

5' CGG TCC GCC CAG GAG CTC TGG GGC GGG GCC GCC GCC CTT GTG CTT
CAG CTG GGC CAC CTT CTT CTT CAG GGC CTG GTT CTT G 3'(SEC ID
N°: 65)

4. Antisentido 2 de CCB-Fc:

5' GCC TTC AGC TGG GCC ACC TTC TTC TTC AGG GCC TGG TAC TCA CCA
CCG AAT TCG CCG GCA 3' (SEC ID N°: 66)

Los oligonucleótidos se reconstituyeron a una concentración de 50 μ M con dH₂O. 5 μ l de cada oligonucleótido se hibridaron entre sí combinando en un tubo de PCR de pared delgada con 2,2 μ l de tampón de restricción n° 2 (es decir, concentración final de Tris-HCl 10 mM a pH 7,9, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, ditiotreitól 1 mM) (New England Biolabs, Beverly, MA) y se calentó a 95 °C durante 30 segundos y luego se dejó hibridar enfriando lentamente durante 2 horas a 25 °C. 5 pmoles de los nuevos oligonucleótidos hibridados se ligaron en un vector pGEM T-Easy como se indica en el manual del kit (Promega, Madison WI). La mezcla de ligación se añadió a 50 μ l de células de *E. coli* competentes DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA) sobre hielo durante 2 minutos, se incubó a 37 °C durante 5 minutos, se incubó sobre hielo durante 2 minutos y luego se sembró en placas de agar con LB+100 μ g/l de ampicilina y se puso a 37 °C durante 14 horas. Las colonias bacterianas individuales se recogieron y se colocaron en 5 ml de LB+100 μ g/l de ampicilina y se dejaron crecer durante 14 horas. Los tubos se centrifugaron a 2000 x g, 4 °C durante 15 minutos y el ADN de vector se aisló usando el kit Qiagen miniprep (Qiagen, Valencia, CA) como se indica en el manual del kit. 2 μ g de ADN se digirieron con NgoM IV-Rsr-II. El fragmento se purificó en gel por el procedimiento de QiAquick como se ha enseñado en el manual del kit (Qiagen, Valencia, CA) y se ligó a pED.dcEpo-Fc con NgoM IV/Rsr II. La ligación se transformó en células de *E. coli* competentes DH5 α y el ADN se preparó como se ha descrito para el vector pGEM T-Easy.

Ejemplo 10: Clonación de la construcción de eritropoyetina-Fc de péptido ácido

La región bisagra del fragmento Fc de IgG1 humana en EPO-Fc del aminoácido 221-229 (numeración EU) se sustituyó con un péptido ácido (CCA). Se usaron cuatro oligonucleótidos solapantes (IDT, Coralville, IA):

1. Sentido 1 de Epo-CCA-Fc:

5' CCG GTG ACA GGG AAT TCG GTG GTG AGT ACC AGG CCC TGG AGA AGG
AGG TGG CCC AGC TGG AG 3' (SEC ID N°: 67)

2. Sentido 2 de Epo-CCA-Fc:

5' GCC GAG AAC CAG GCC CTG GAG AAG GAG GTG GCC CAG CTG GAG
CAC GAG GGT GGT GGT CCC GCT CCA GAG CTG CTG GGC GGA CA 3' (SEC
ID N°: 68)

3. Antisentido 1 de Epo-CCA-Fc:

5' GTC CGC CCA GCA GCT CTG GAG CGG GAC CAC CAC CCT CGT GCT CCA
GCT GGG CCA C 3' (SEC ID N°: 69)

4. Antisentido 2 de Epo-CCA-Fc:

5' CTC CTT CTC CAG GGC CTG GTT CTC GGC CTC CAG CTG GGC CAC CTC
CTT CTC CAG GGC CTG GTA CTC ACC ACC GAA TTC CCT GTC ACC GGA
3' (SEC ID N°: 70)

Los oligonucleótidos se reconstituyeron a una concentración de 50 μ M con dH₂O. 5 μ l de cada oligonucleótido se hibridaron entre sí combinando en un tubo de PCR de pared delgada con 2,2 μ l de tampón de restricción n° 2 (New England Biolabs, Beverly, MA) y se calentaron a 95 °C durante 30 segundos y luego se dejaron enfriar lentamente durante 2 horas a 25 °C. 5 pmoles de los oligonucleótidos ahora hibridados se ligaron en un vector pGEM T-Easy como se ha indicado en el manual del kit (Promega, Madison, WI). La mezcla de ligación se añadió a 50 μ l de células de *E. coli* competentes DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA) sobre hielo durante 2 minutos, se incubaron a 37 °C 5 minutos, se incubaron sobre hielo durante 2 minutos y luego se sembraron en placas de agar de LB+100 μ g/l de ampicilina y se pusieron a 37 °C durante 14 horas. Las colonias bacterianas individuales se recogieron y se pusieron en 5 ml de LB+100 μ g/l de ampicilina y se dejaron crecer durante 14 horas. Los tubos se centrifugaron a 2000 x g, 4 °C durante 15 minutos y el vector ADN se preparó usando el kit Qiagen miniprep (Qiagen, Valencia, CA) como se indica en el manual del kit. Se digirieron 2 μ g de ADN con Age I-Rsr-II. El fragmento se purificó en gel por el procedimiento QIAquick como se ha enseñado en el manual del kit (Qiagen, Valencia, CA) y se ligó en pED.Epo Fc.1 Age I-Rsr II. La ligación se transformó en células de *E. coli* competentes DH5 α y se preparó ADN como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 11: Clonación de la construcción de Cys-Fc

Usando PCR y técnicas de biología molecular convencional (Sambrook y col. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press), una construcción de expresión de mamífero se generó de forma que la secuencia codificante para el péptido señal de IFN α humano se apoyara directamente contra la secuencia codificante de Fc que empieza en el primer residuo de cisteína (Cys 226, numeración EU). Tras la escisión y secreción de peptidasa señal de células de mamífero así se generó una proteína Fc con un residuo de cisteína del extremo N. Brevemente, los cebadores

IFNa-Sig-F (IFNa-Sig-F: 5'-GCTACTGCAGCCACCATGGCCTTGACCTT TGCTTTAC-3')(SEQ ID NO:71) y Cys-Fc-R (5'-CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCGGAGAGCCCACAGAGCAGCTTG-3') (SEQ ID N°: 72) se usaron en una reacción de PCR para crear un fragmento que enlazara la secuencia señal de IFNa con el extremo N de Fc, empezando con Cys 226. 500 ng del ligante Δ de pED.dC.hIFN α nativo se añadieron a 25 pmoles de cada cebador en una reacción de PCR con el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico MJ usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 50 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos) y finalmente 72 °C 10 minutos. La banda de tamaño esperado (~112 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA), se digirió con las enzimas de restricción PstI y BspEI, se purificó en gel y se subclonó en los sitios correspondientes del ligante Δ de pED.dC.hIFN α nativo para generar pED.dC.Cys-Fc (Figura 5).

Ejemplo 12: Expresión y preparación de proteínas de Fc-MESNA

La secuencia codificante para Fc (la región constante de IgG1 humana) se obtuvo por amplificación por PCR a partir un plásmido que contiene Fc usando condiciones y reactivos convencionales, siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante para subclonar la secuencia codificante de Fc *NdeI/SapI*. Brevemente, los cebadores 5'- GTGGTCATA TGGGCATTGAAGGCAGAGGCGCCGCTGCGGTCG - 3' (SEQ ID N°: 73) y 5' - GGTGGTTGC TCTTCCGCAAAAACCCGGAGACAGGGAGAGACTCTTCTGCG - 3' (SEQ ID N°: 74) se usaron para amplificar la secuencia de Fc a partir de 500 ng del plásmido pED.dC.Epo-Fc usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Basilea, Suiza) en un ciclador térmico RapidCycler (Idaho Technology Salt Lake City, Utah), desnaturalizando a 95 °C durante 2 minutos seguido de 18 ciclos de 95 °C durante 0 s, 55 °C durante 0 s y 72 °C durante 1 minuto con una pendiente de 4, seguido de extensión de 72 °C durante 10 minutos. El producto de PCR se subclonó en un vector de clonación intermedio y se secuenció completamente, y luego se subclonó usando los sitios *NdeI* y *SapI* en el vector pTWIN1 siguiendo procedimientos convencionales. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed.; Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Este plásmido se transformó entonces en células BL21(DE3) pLysS usando procedimientos convencionales. Igual. 1 litro de cultivo de células se cultivó a una lectura de absorbancia de 0,8 UA a 37 °C, se indujo con isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido 1 mM y se cultivó durante la noche a 25 °C. Las células se sedimentaron por centrifugación, se lisaron en Tris 20 mM 8,8/1% de NP40/ fluoruro de fenilmetanosulfonilo 0,1 mM / 1 µg/ml de Benzonase (Novagen Madison, WI) y se unieron a perlas de quitina (New England Biolabs; Beverly, MA) durante la noche a 4 °C. Las perlas se lavaron entonces con varios volúmenes de columna de Tris 20 mM a 8,5/ NaCl 500 mM / EDTA 1 mM y luego se guardaron a -80 °C. Se generó Fc-MESNA purificada eluyendo la proteína de las perlas en Tris 20 mM a 8,5/ NaCl 500 mM / EDTA 1 mM / ácido 2-mercaptoetanosulfónico 500 mM (MESNA) y el eluato se usó directamente en la reacción de acoplamiento, más adelante.

Ejemplo 13: Expresión y purificación de híbrido de monómero-dímero de factor VII-Fc

Se establecieron células CHO DG-44 que expresan factor VII-Fc. Se cultivaron células CHO DG-44 a 37 °C, 5% de CO₂, en MEM Alfa más nucleósido y ribonucleósidos y se complementó con 5% de suero bovino fetal inactivado con calor hasta la transfección.

Se sembraron células DG44 en placas de Petri de cultivo de tejido de 100 mm y se cultivaron a una confluencia del 50%- 60%. Se usó un total de 10 µg de ADN para transfectar una placa de 100 mm: 7,5 µg de pED.dC.FVII-Fc + 1,5 µg de pcDNA3/Flag-Fc + 1 µg de pcDNA6-PACE. Las células se transfectaron como se describe en el manual del reactivo de transfección Superfect (Qiagen, Valencia, CA). El medio se eliminó de la transfección después de 48 horas y se sustituyó con MEM Alfa sin nucleósidos más 5% de suero bovino fetal dializado y 10 µg/ml de blasticidina (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 0,2 mg/ml de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 10 días, las células se liberaron de la placa con 0,25% de tripsina y se transfirieron a matraces de cultivo de tejido T25, y la selección continuó durante 10-14 días hasta que las células empezaron a cultivarse bien a medida que se establecieron las líneas celulares estables. La expresión de proteínas se amplificó posteriormente mediante la adición de metotrexato 25 nM.

Se usaron aproximadamente 2×10^7 células para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella rotatoria de 1700 cm² (Coming, Coming, NY) complementada con 5 µg/ml de vitamina K₃ (menadiona bisulfato de sodio) (Sigma, St Louis, MO). Las botellas rotatorias se incubaron en 5% de CO₂ a 37 °C durante 72 horas. Entonces el medio de crecimiento se intercambiaba con 300 ml de medio de producción libre de suero (DMEM/F12 con 5 µg/ml de insulina bovina y 10 µg/ml de gentamicina) complementado con 5 µg/l de vitamina K₃. El medio de producción (medio acondicionado) se recogió cada día durante 10 días y se guardó a 4 °C. Se añadió medio de producción fresco a las botellas rotatorias después de cada recogida y las botellas se devolvieron a la estufa de incubación. Los medios reunidos se clarificaron primero usando un filtro de fibra de vidrio Sartoclean (3,0 µm + 0,2 µm) (Sartorius Corp. Gottingen, Alemania), seguido de un filtro Acropack 500 (0,8 µm + 0,2 µm) (Pall Corp., East Hills, NY). El medio clasificado se concentró entonces aproximadamente 20 veces usando casetes de filtración de flujo tangencial Pellicon Biomax (10 kDa de MWCO) (Millipore Corp., Billerica, MA).

Entonces, las quimeras de Fc se capturaron del medio concentrado por pase sobre una columna de proteína A-Sepharose 4 Fast Flow (AP Biotech, Piscataway, NJ). Una columna de 5 x 5 cm (100 ml) se cargó con ≤ 5 mg de proteína Fc por ml de volumen de columna a una velocidad de flujo lineal de 100 cm/hora para lograr un tiempo de residencia de ≥ 3 minutos. La columna se lavó entonces con >5 volúmenes de columna de 1X DPBS para eliminar proteínas no específicamente unidas. Las proteínas unidas se eluyeron con glicina 100 mM a pH 3,0. Las fracciones de elución que contenían el pico de proteína se neutralizaron entonces añadiendo 1 parte de Tris-HCl 1 M, pH 8, a 10 partes de fracción eluida.

Para eliminar homodímeros FLAG-Fc (es decir, dímeros quiméricos de Fc con el péptido FLAG expresado como fusiones con ambas moléculas de Fc) de la preparación, el conjunto de proteína A-Sepharose 4 Fast Flow se pasó sobre una columna de intercambio catiónico Unosphere S (BioRad Corp., Richmond, CA). Bajo las condiciones de operación para la columna, el híbrido de monómero-dímero FLAG-Fc está sin carga (pl teórico de FLAG-Fc=6,19) y circula por la columna mientras que las construcciones de hFVII-Fc están positivamente cargadas, y así se unen a la columna y se eluyen a mayor fuerza iónica. El conjunto de proteína A-Sepharose 4 Fast Flow se dializó primero en

MES 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,1. El material dializado se cargó entonces sobre una columna de 1,1 x 11 cm (9,9 ml) a 150 cm/hora. Durante el lavado y la elución, la velocidad de flujo aumentó a 500 cm/hora. La columna se lavó secuencialmente con 8 volúmenes de columna de MES 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,1 y 8 volúmenes de columna de MES 20 mM, NaCl 40 mM, pH 6,1. La proteína unida se eluyó con MES 20 mM, NaCl 750 mM, pH 6,1. Las fracciones de elución que contienen el pico de proteína se reunieron y se esterizaron por filtración a través de un disco de filtro de 0,2 µm antes del almacenamiento a -80 °C.

Se usó una columna de afinidad de MAB anti-FLAG para separar dímeros quiméricos de Fc con HFVII fusionado a ambas moléculas de Fc de aquellas con un péptido FLAG y una fusión de HFVII. El conjunto Unosphere S Eluate se diluyó 1:1 con Tris 20 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 8, y se cargó sobre una columna de Sepharose de 1,6 x 5 cm M2 anti-FLAG (Sigma Corp., St. Louis, MO) a una velocidad de flujo lineal de 60 cm/hora. La carga se dirigió a < 2,5 mg de híbrido de monómero-dímero /ml de volumen de columna. Después de cargar la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 8,0, los híbridos de monómero-dímero se eluyeron entonces con glicina 100 mM, pH 3,0. Las fracciones de elución que contenían el pico de proteína se neutralizaron entonces añadiendo 1 parte de Tris-HCl 1 M, pH 8, a 10 partes de fracción eluida. Los conjuntos se almacenaron a -80 °C.

Ejemplo 14: Expresión y purificación de homodímero e híbrido de monómero-dímero de factor IX-Fc

Se establecieron células CHO DG-44 que expresan factor IX-Fc. Se sembraron células DG44 en placas de Petri de cultivo de tejido de 100 mm y se cultivaron a una confluencia del 50%- 60%. Se usó un total de 10 µg de ADN para transfectar una placa de 100 mm: para la transfección del homodímero se usaron 8 µg de pED.dC.factor IX-Fc + 2 µg de pcDNA6-PACE; para la transfección del híbrido de monómero-dímero se usaron 8 µg de pED.dC.factor IX-Fc + 1 µg de pcDNA3-Flag-Fc + 1 µg de pcDNA6-PACE. Las células se transfectaron como se describe en el manual del reactivo de transfección Superfect (Qiagen, Valencia, CA). El medio se eliminó de la transfección después de 48 horas y se sustituyó con MEM Alfa sin nucleósidos más 5% de suero bovino fetal dializado y 10 µg/ml de blasticidina (Invitrogen, Carlsbad, CA) para ambas transfecciones, mientras que la transfección del híbrido de monómero-dímero también se complementó con 0,2 mg/ml de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 3 días, las células se liberaron de la placa con 0,25% de tripsina y se transfirieron a matraces de cultivo de tejido T25, y la selección continuó durante 10-14 días hasta que las células empezaron a crecer bien a medida que se establecieron líneas celulares estables. La expresión de proteína se amplificó posteriormente mediante la adición de metotrexato 10 nM o 100 nM para el homodímero o híbrido de monómero-dímero, respectivamente.

Para ambas líneas celulares se usaron aproximadamente 2×10^7 células para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella rotatoria de 1700 cm² (Coming, Coming, NY) complementado con 5 µg/L de vitamina K₃ (menadiona bisulfato de sodio) (Sigma, St. Louis, MO). Las botellas rotatorias se incubaron en 5% de CO₂ a 37 °C durante aproximadamente 72 horas. El medio de crecimiento se intercambió con 300 ml de medio de producción libre de suero (DMEM/F12 con 5 µg/ml de insulina bovina y 10 µg/ml de gentamicina) complementado con 5 µg/L de vitamina K₃. El medio de producción (medio acondicionado) se recogió cada día durante 10 días y se guardó a 4 °C. Se añadió medio de producción fresco a las botellas rotatorias después de cada recogida y las botellas se devolvieron a la estufa de incubación. Antes de la cromatografía, el medio se clarificó usando un filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 µm) (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI). Todas las siguientes etapas se realizaron a 4 °C. El medio clarificado se aplicó a proteína A-Sepharose, se lavó con 5 volúmenes de columna de 1X PBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM), se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,7, y luego se neutralizó con 1/10 volumen de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. La proteína se dializó entonces en PBS.

La muestra de proteína de transfección del híbrido de monómero-dímero se sometió a más purificación, ya que contuvo una mezcla de homodímero de FIX-Fc:FIX-Fc, híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc:Flag-Fc y homodímero de Flag-Fc:Flag-Fc. El material se concentró y se aplicó a una columna de 2,6 cm x 60 cm (318 ml) Superdex 200 Prep Grade a una velocidad de flujo de 4 ml/minuto (36 cm/hora) y luego se eluyó con 3 volúmenes de columna de 1X PBS. Las fracciones correspondientes a dos picos en el detector de UV se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones del primer pico contuvieron tanto homodímero de FIX-Fc:FIX-Fc como híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc:Flag-Fc, mientras que el segundo pico contuvo homodímero de Flag-Fc:Flag-Fc. Todas las fracciones que contenían el híbrido de monómero-dímero, pero no el homodímero de Flag-Fc:Flag-Fc, se reunieron y se aplicaron directamente a una columna de Sepharose de 1,6 x 5 cm M2 anti-FLAG (Sigma Corp., St. Louis, MO) a una velocidad de flujo lineal de 60 cm/hora. Después de la carga, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de PBS. Los híbridos de monómero-dímero se eluyeron entonces con glicina 100 mM, pH 3,0. Las fracciones de elución que contenían la proteína pico se neutralizaron entonces añadiendo 1/10 volumen de Tris-HCl 1 M y se analizaron por SDS-PAGE reductora y no reductora. Las fracciones se dializaron en PBS, se concentraron a 1-5 mg/ml y se guardaron a -80 °C.

Ejemplo 15: Expresión y purificación de homodímero e híbrido de monómero-dímero de hIFN α

Se establecieron células CHO DG-44 que expresan hIFN α . Células DG44 se sembraron en placas de Petri de cultivo de tejido de 100 mm y se cultivaron a una confluencia del 50%-60%. Se usó un total de 10 µg de ADN para transfectar una placa de 100 mm: para la transfección del homodímero 10 µg de las construcciones de hIFN α -Fc; para la transfección del híbrido de monómero-dímero 8 µg de las construcciones de hIFN α -Fc + 2 µg de pcDNA3-

Flag-Fc. Las células se transfectaron como se describe en el manual del reactivo de transfección Superfect (Qiagen, Valencia, CA). El medio se eliminó de la transfección después de 48 horas y se sustituyó con MEM Alfa sin nucleósidos más 5% de suero bovino fetal dializado, mientras que la transfección del híbrido de monómero-dímero también se complementó con 0,2 mg/ml de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 3 días, las células se liberaron de la placa con 0,25% de tripsina y se transfirieron a matraces de cultivo de tejido T25, y la selección continuó durante 10-14 días hasta que las células empezaron a cultivarse bien y se establecieron líneas celulares estables. La expresión de proteína se amplificó posteriormente mediante la adición de metrotrexato: que oscila de 10 a 50 nM.

Para todas las líneas celulares se usaron aproximadamente 2×10^7 células para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella rotatoria de 1700 cm² (Coming, Coming, NY). Las botellas rotatorias se incubaron en 5% de CO₂ a 37 °C durante aproximadamente 72 horas. Entonces, el medio de crecimiento se intercambió con 300 ml de medio de producción libre de suero (DMEM/F12 con 5 µg/ml de insulina bovina y 10 µg/ml de gentamicina). El medio de producción (medio acondicionado) se recogió cada día durante 10 días y se guardó a 4 °C. Se añadió medio de producción fresco a las botellas rotatorias después de cada recogida y las botellas se devolvieron a la estufa de incubación. Antes de la cromatografía, el medio se clarificó usando un filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 µm) de Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Todas las siguientes etapas se realizaron a 4 °C. El medio clarificado se aplicó a proteína A-Sepharose, se lavó con 5 volúmenes de columna de 1X PBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM), se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,7, y luego se neutralizó con 1/10 volumen de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. La proteína se dializó entonces en PBS.

Las muestras de proteína de transfección del híbrido de monómero-dímero se sometieron entonces a purificación adicional, ya que contuvieron una mezcla de homodímero de IFN α -Fc:IFN α -Fc, híbrido de monómero-dímero de IFN α -Fc:Flag-Fc y homodímero de Flag-Fc:Flag-Fc (o ligante Δ o ligante GS15). El material se concentró y se aplicó a una columna de 2,6 cm x 60 cm (318 ml) Superdex 200 Prep Grade a una velocidad de flujo de 4 ml/min (36 cm/h) y luego se eluyó con 3 volúmenes de columna de 1X PBS. Las fracciones correspondientes a dos picos en el detector de UV se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones del primer pico contuvieron tanto homodímero de IFN α -Fc:IFN α -Fc como híbrido de monómero-dímero de IFN α -Fc:Flag-Fc, mientras que el segundo pico contuvo homodímero de Flag-Fc:Flag-Fc. Todas las fracciones que contenían el híbrido de monómero-dímero, pero no el homodímero de Flag-Fc, se reunieron y se aplicaron directamente a una columna de Sepharose de 1,6 x 5 cm M2 anti-FLAG (Sigma Corp., St. Louis, MO) a una velocidad de flujo lineal de 60 cm/hora. Después de la carga la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de PBS. Los híbridos de monómero-dímero se eluyeron entonces con glicina 100 mM, pH 3,0. Las fracciones de elución que contenían el pico de proteína se neutralizaron entonces añadiendo 1/10 volumen de Tris-HCl 1 M y se analizaron por SDS-PAGE reductora y no reductora. Las fracciones se dializaron en PBS, se concentraron a 1-5 mg/ml y se guardaron a -80 °C.

Ejemplo 16: Expresión y purificación de proteínas superenrolladas

Los plásmidos, pED.dC Epo-CCA-Fc y pED.dC CCB-Fc se transfectarán tanto solos como juntos a una relación 1:1 en células CHO DG44. Las células se transfectarán como se describe en el manual del reactivo de transfección Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Los medios se eliminarán después de 48 horas y se sustituirán con MEM Alfa sin nucleósidos más 5% de suero bovino fetal dializado. La purificación se hará por cromatografía de afinidad sobre una columna de proteína A según procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, la purificación puede lograrse usando cromatografía de exclusión por tamaño.

Ejemplo 17: Expresión y purificación de Cys-Fc

Se establecieron células CHO DG-44 que expresan Cys-Fc. El plásmido de expresión pED.dC.Cys-Fc, que contiene el gen dihidrofolato reductasa (dhfr) de ratón, se transfectó en células CHO DG44 (deficientes en dhfr) usando el reactivo Superfect (Qiagen; Valencia, CA) según el protocolo del fabricante, seguido de selección para transfectantes estables en medio de cultivo de tejido α MEM (sin nucleósidos) complementado con 5% de SBF dializado y los antibióticos penicilina/estreptomomicina (Invitrogen; Carlsbad, CA) durante 10 días. El conjunto resultante de células establemente transfectadas se amplificó entonces con metrotrexato 50 nM para aumentar la expresión. Se usaron aproximadamente 2×10^7 células para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella rotatoria de 1700 cm² (Coming, Corning, NY). Las botellas rotatorias se incubaron en 5% de CO₂ a 37 °C durante aproximadamente 72 horas. El medio de crecimiento se intercambió con 300 ml de medio de producción libre de suero (DMEM/F12 con 5 µg/ml de insulina bovina y 10 µg/ml de gentamicina). El medio de producción (medio acondicionado) se recogió cada día durante 10 días y se guardó a 4 °C. Se añadió medio de producción fresco a las botellas rotatorias después de cada recogida y las botellas se devolvieron a la estufa de incubación. Antes de la cromatografía, el medio se clarificó usando un filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 µm) de Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Todas las siguientes etapas se realizaron a 4 °C. El medio clarificado se aplicó a proteína A-Sepharose, se lavó con 5 volúmenes de columna de 1X PBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM), se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,7, y luego se neutralizó con 1/10 volumen de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. La proteína se dializó en PBS y se usó directamente en reacciones de conjugación.

Ejemplo 18: Acoplamiento de T20-tioésteres a Cys-Fc

Se incubaron Cys-Fc (4 mg, concentración final de 3,2 mg/ml) y tanto T20-tioéster como T20-PEG-tioéster (2 mg, aproximadamente 5 equivalentes molares) durante 16 horas a temperatura ambiente en Tris 0,1 M 8/MESNA 10 mM. El análisis por SDS-PAGE (gel Tris-Gly) usando tampón de muestra reductor indicó la presencia de una nueva banda de aproximadamente 5 kDa mayor que el control de Fc (>40-50% de conversión en el conjugado). La secuenciación del extremo N previa de Cys-Fc y Cys-Fc sin reaccionar indicó que el péptido señal está incorrectamente procesado en una fracción de las moléculas, quedando una mezcla de (Cys)-Fc, que reaccionará mediante ligación nativa con péptido-tioésteres, y (Val)-(Gly)-(Cys)-Fc, que no reaccionará. Como las condiciones de reacción son insuficientes para afectar la dimerización de las moléculas de Cys-Fc, esta reacción generó una mezcla de homodímeros de T20-Cys-Fc:T20-Cys-Fc, híbridos de monómero-dímero de T20-Cys-Fc:Fc y dímeros de Fc de Cys-Fc:Cys-Fc. Esta proteína se purificó usando cromatografía de exclusión por tamaño como se indica anteriormente para separar las tres especies. El resultado se confirmó por análisis de SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras.

Ejemplo 19: Ensayo antiviral para actividad de IFN α

La actividad antiviral (UI/ml) de proteínas de fusión de IFN α se determinó usando un ensayo de CPE (efecto citopático). Se sembraron células A549 en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos en medio de crecimiento (RPMI 1640 complementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y L-glutamina 2 mM) durante 2 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Los patrones de IFN α y las proteínas de fusión de IFN α se diluyeron en medio de crecimiento y se añadieron a células por triplicado durante 20 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Tras la incubación, todos los medios se eliminaron de los pocillos, el virus de la encefalomiocarditis (EMC) se diluyó en medio de crecimiento y se añadió (3000 ufp/pocillo) a cada pocillo, con la excepción de los pocillos de control. Las placas se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ durante 28 horas. Las células vivas se fijaron con 10% de ácido tricloroacético (TCA) frío y luego se tiñeron con sulforrodamina B (SRB) según protocolos publicados (Rubinstein y col. 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82, 1113). El colorante SRB se solubilizó con Tris 10 mM a pH 10,5 y se leyó en un espectrofotómetro a 490 nm. Las muestras se analizaron comparando actividades con una curva patrón dada, el patrón internacional de IFN α 2b de la Organización Mundial de la Salud que oscila de 5 a 0,011 UI/ml. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 3 y la Figura 6 y demuestran la elevada actividad antiviral de híbridos de monómero-dímero.

TABLA 3: ENSAYO ANTIVIRAL DE INTERFERÓN**HOMODÍMERO FRENTE A HÍBRIDO DE MONÓMERO-DÍMERO**

Proteína	Actividad antiviral (UI/nmol)	Desv est
Homodímero del ligante de 8 aa de IFN α -Fc	0,45 × 10 ⁵	0,29 × 10 ⁵
Híbrido de monómero-dímero de IFN α -Fc ligante de 8 aa:Flag-Fc	4,5 × 10 ⁵	1,2 × 10 ⁵
Homodímero del ligante Δ de IFN α -Fc	0,22 × 10 ⁵	0,07 × 10 ⁵
Híbrido de monómero-dímero de IFN α -Fc ligante delta Δ :Flag-Fc	2,4 × 10 ⁵	0,0005 × 10 ⁵
Homodímero del ligante GS15 de IFN α -Fc	2,3×10 ⁵	1,0×10 ⁵
Híbrido de monómero-dímero del ligante GS15 de IFN α -Fc	5,3×10 ⁵	0,15×10 ⁵

Ejemplo 20: Análisis de la actividad de coagulación de FVIIa

El kit de ensayo de FVIIa-rTF StaClot se compró de Diagnostica Stago (Parsippany, NJ) y se modificó como se describe en Johannessen y col. 2000, Blood Coagulation and Fibrinolysis 11:S159. Se realizó una curva patrón con el patrón de FVIIa de la Organización Mundial de la Salud 89/688. El ensayo se usó para comparar la actividad de coagulación de híbridos de monómero-dímero en comparación con homodímeros. Los resultados mostraron que el híbrido de monómero-dímero tuvo cuatro veces la actividad de coagulación en comparación con el homodímero (Figura 7).

Ejemplo 21: Dosificación oral de FVIIa-Fc en ratas de 10 días

Se compraron ratas Sprague Dawley de 25 gramos recién nacidas de 9 días de Charles River (Wilmington, MA) y se dejaron aclimatar durante 24 horas. Las ratas se dosificaron por vía oral con homodímero de FVIIa-Fc, híbrido de monómero-dímero o una mezcla 50:50 de los dos. Se administró un volumen de 200 μ l de una disolución de FVIIa-Fc para una dosis de 1 mg/kg. La disolución estuvo compuesta de un tampón Tris-HCl a pH 7,4 con 5 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja. Las ratas se sacrificaron con CO₂ en varios momentos de tiempo y se sacaron 200 μ l de sangre por punción cardíaca. Se obtuvo plasma mediante la adición de una disolución al 3,8% de citrato de sodio y

centrifugación a temperatura ambiente a una velocidad de 1268 x g. Las muestras de plasma se ensayaron tanto frescas como congeladas a 20 °C. El híbrido de monómero-dímero dosificado por vía oral produjo concentraciones en suero máximas ($C_{m\acute{a}x}$) significativamente mayores en comparación con el factor VII homodimérico (Figura 8).

Ejemplo 22: Dosificación oral de ratas neonatas con factor IX-Fc

- 5 Ratas neonatas Sprague-Dawley de diez días de edad se dosificaron p.o. con 200 μ l de homodímero de FIX-Fc o híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc:Flag-Fc a dosis aproximadamente equimolares de 10 nmol/kg en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,5 que contiene 5 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja y 0,9% de NaCl. A 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 horas después de la inyección, los animales se sacrificaron con CO₂, se extrajo sangre mediante punción cardíaca y se obtuvo plasma mediante la adición de una disolución al 3,8% de citrato de sodio y centrifugación a 10 temperatura ambiente a una velocidad de 1268 x g. Las muestras se sedimentaron entonces por centrifugación, se recogió el suero y se congeló a -20 °C hasta el análisis de las proteínas de fusión por ELISA.

Ejemplo 23: ELISA de factor IX-Fc

- 15 Una placa de ELISA Immulon 4HBX de 96 pocillos (Thermo LabSystems, Vantaa, Finlandia) se recubrió con 100 μ l/pocillo de IgG de cabra anti-factor IX (Affinity Biologicals, Ancaster, Canadá) diluida 1:100 en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas o durante la noche a 4 °C cerradas con película de plástico. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBST, 300 μ l/pocillo usando el lavador de placas TECAN. Los pocillos se bloquearon con PBST + 6% de BSA, 200 μ l/pocillo, y se incubaron 90 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBST, 300 μ l/pocillo usando el lavador de placas TECAN. Los 20 patrones y muestras de sangre de ratas descritos en el Ejemplo 18 se añadieron a los pocillos (100 μ l/pocillo) y se incubaron 90 minutos a temperatura ambiente. Las muestras y patrones se diluyeron en tampón HBET (HBET: 5,95 g de HEPES, 1,46 g de NaCl, 0,93 g de Na₂EDTA, 2,5 g de albúmina de suero bovino, 0,25 ml de Tween-20, llevar a 250 ml con dH₂O, ajustar a pH 7,2). El intervalo de la curva patrón fue de 200 ng/ml a 0,78 ng/ml con diluciones de 2 veces entre ellas. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBST, 300 μ l/pocillo usando el lavador de placas TECAN. A cada pocillo se añadieron 100 μ l/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG humana-Fc-HARP conjugado (Pierce, Rockford, IL) diluido en HBET 1:25.000. Las placas se incubaron 90 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBST, 300 μ l/pocillo usando el lavador de placas TECAN. Las placas se revelaron con 100 25 μ l/pocillo de sustrato de peroxidasa de tetrametilbencidina (TMB) (Pierce, Rockford, IL) añadido según las instrucciones del fabricante. Las placas se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad o hasta que se reveló el color. La reacción se detuvo con 100 μ l/pocillo de ácido sulfúrico 2 M. La absorbancia se leyó a 450 nm en el lector SpectraMax plusplate (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El análisis de sangre extraído a las 4 horas 30 indicó una diferencia de más de 10 veces en la concentración en suero entre híbridos de monómero-dímero de factor IX-Fc en comparación con homodímeros de factor IX-Fc (Figura 9). Los resultados indicaron que los niveles de híbrido de monómero-dímero de factor IX-Fc fueron coherentemente superiores a los de homodímeros del factor IX-Fc (Figura 10).

Ejemplo 24: Clonación de Epo-Fc

- Se obtuvo la región codificante de Epo madura por amplificación por PCR de un plásmido que codifica la secuencia codificante de eritropoyetina madura, originalmente obtenida por RT-PCR de ARNm de Hep G2, y cebadores hepoxba-F y hepoeco-R, indicados más adelante. El cebador hepoxba-F contiene un sitio *Xba*I, mientras que el cebador hepoeco-R contiene un sitio *Eco*RI. La PCR se llevó a cabo en el Idaho Technology RapidCycler usando 40 Vent polimerasa, desnaturizando a 95 °C durante 15 segundos, seguido de 28 ciclos con una pendiente de 6,0 de 95 °C durante 0 segundos, 55 °C durante 0 segundos y 72 °C durante 1 minuto 20 segundos, seguido de extensión de 3 minutos a 72 °C. Un producto de aproximadamente 514 pb se purificó en gel, se digirió con *Xba*I y *Eco*RI, se purificó en gel de nuevo y se subclonó direccionalmente en un vector pED.dC.XFc purificado en gel digerido con *Xba*I/*Eco*RI, mencionado anteriormente. Esta construcción se llamó pED.dC.Epo-Fc.

- 45 La secuencia de Epo, que contiene tanto el péptido señal endógeno como la secuencia madura, se obtuvo por amplificación por PCR usando una preparación de ADNc del clon QUICK de riñón adulto como molde y cebadores Epo+Pep-Sbf-F y Epo+Pep-Sbf-R, descritos más adelante. El cebador Epo+Pep-Sbf-F contiene un sitio *Sbf*I en la dirección 5' del codón de iniciación, mientras que el cebador Epo+Pep-Sbf-R se hibrida en la dirección 3' del sitio *Sbf*I endógeno en la secuencia Epo. La reacción de PCR se llevó a cabo en el ciclador térmico PTC-200 MJ usando 50 Expand polimerasa, desnaturizando a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 32 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 57 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 45 segundos, seguido de una extensión de 10 minutos a 72 °C. Un producto de aproximadamente 603 pb se aisló en gel y se subclonó en el vector pGEM-T Easy. La secuencia codificante correcta se escindió por digestión con *Sbf*I, se purificó en gel y se clonó en el plásmido pED.dC.Epo-Fc digerido con *Pst*I, tratado con fosfatasa alcalina de gamba (SAP) y purificado en gel. El plásmido con el inserto en la 55 orientación correcta se determinó inicialmente por digestión con *Kpn*I. Una digestión *Xmn*I y *Pvu*II de esta construcción se comparó con pED.dC.Epo-Fc y se confirmó que estaba en la orientación correcta. La secuencia se determinó y la construcción se llamó pED.dC.natEpo-Fc. Cebadores de PCR:

hepoxba-F (EPO-F): 5'-AATCTAGAGCCCCACCACGCCTCATCTGTGAC-3' (SEQ ID N°: 75)

hepoco-R (EPO-R): 5'-TTGAATTCTCTGTCCCCTGTCCCTGCAGGCC-3' (SEQ ID N°: 76)

Epo+Pep-Sbf-F: 5'-GTACCTGCAGGCGGAGATGGGGGTGCA-3' (SEQ ID N°: 77)

Epo+Pep-Sbf-R: 5'-CCTGGTCATCTGTCCCCTGTCC-3' (SEQ ID N°: 78)

Ejemplo 25: Clonación de Epo-Fc

- 5 Un procedimiento alternativo de clonación de EPO-Fc se describe en la presente memoria. Primero se diseñaron los cebadores para amplificar la secuencia codificante de Epo de longitud completa, que incluye la secuencia señal nativa, del siguiente modo:

Epo-F: 5'-GTCCAACCTG CAGGAAGCTTG CCGCCACCAT GGGAGTGCAC GAATGTCTG CCTGG- 3'(SEQ ID NO:79)

Epo-R: 5'-GCCGAATTCA GTTTTGTGCGA CCGCAGCGG CGCCGGCGAA CTCTCTGTCC CCTGTTCTGC AG-GCCTCC- 3'(SEQ ID NO:80)

- 10 El cebador directo incorpora un sitio SbfI y HindIII en la dirección 5' de una secuencia de Kozak, mientras que el cebador inverso elimina el sitio SbfI interno, y añade un ligante de 8 aminoácidos al extremo 3' de la secuencia codificante (EFAGAAAV) (SEQ ID N°: 81), además de sitios de restricción Sall y EcoRI. La secuencia codificante de Epo se amplificó entonces a partir de una biblioteca de ADNc de riñón (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) usando 25 pmoles de estos cebadores en una reacción de PCR de 25 µl usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos), seguido de 72 °C durante 10 minutos. La banda de tamaño esperado (641 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia, CA) y se ligó en el vector de clonación intermedio pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI). El ADN se transformó en células DH5α (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivaron cultivos miniprep y se purificaron con un kit Miniprep de plásmidos (Qiagen, Valencia, CA), ambos según protocolos convencionales del fabricante. Una vez se confirmó la secuencia, este inserto se digirió con enzimas de restricción SbfI/EcoRI, se purificó en gel y se clonó en los sitios PstI/EcoRI del vector de expresión de mamífero pED.dC de un modo similar.

Se diseñaron cebadores para amplificar la secuencia codificante para la región constante de IgG1 humana (la región Fc, numeración EU 221-447) del siguiente modo:

Fc-F: 5'-GCTGCGGTCG ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CTCCGGAACCT CCTGGGCGGA CCGTCAGTC- 3'(SEQ ID NO:82)

- 25 Fc-R 5'-ATTGGAATTC TCATTTACCC GGAGACAGGG AGAGGC- 3'(SEQ ID NO:83)

- 30 El cebador directo incorpora un sitio Sall en el empalme de ligante-Fc, además de introducir sitios BspEI y RsrII en la región Fc sin afectar la secuencia codificante, mientras que el cebador inverso añade un sitio EcoRI después del codón de terminación. La secuencia codificante de Fc se amplificó entonces a partir de una biblioteca de ADNc de leucocitos (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) usando 25 pmoles de estos cebadores en una reacción de PCR de 25 µl usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos), seguido de 72 °C durante 10 minutos. La banda de tamaño esperado (696 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia, CA) y se ligó en el vector de clonación intermedio pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI). Se transformó ADN en células DH5α (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivaron cultivos miniprep y se purificaron con un kit Miniprep de plásmidos (Qiagen, Valencia, CA), ambos según protocolos convencionales del fabricante. Una vez se confirmó la secuencia, el inserto se digirió con enzimas de restricción SalI/EcoRI, se purificó en gel y se clonó en los sitios Sall/EcoRI del plásmido pED.dC.Epo (anteriormente) de una manera similar, para generar el plásmido de expresión de mamífero pED.dC.Epo-Fc. En otro experimento este plásmido también se digirió con RsrII/XmaI, y el fragmento correspondiente de pSYN-Fc-002, que contiene la mutación Asn 297 Ala (numeración EU), se clonó para crear pED.dC.EPO-Fc N297A (pSYN-EPO-004). La expresión en células de mamífero fue como se ha descrito en el Ejemplo 26. La secuencia de aminoácidos de Epo-Fc con un ligante de ocho aminoácidos se proporciona en la Figura 2j. Durante el procedimiento de este procedimiento de clonación alternativo, aunque se preservó la secuencia de aminoácidos de Epo-Fc exacta (Figura 2J), se hicieron varios cambios no codificantes al nivel de nucleótidos (Figura 3J). Éstos son G6A (G en el nucleótido 6 cambió a A) (eliminar posible estructura secundaria en el cebador), G567A (elimina el sitio SbfI endógeno de Epo), A582G (elimina el sitio EcoRI del ligante), A636T y T639G (añade sitio BspEI único a Fc) y G651C (añade sitio RsrII único a Fc). La secuencia de nucleótidos en la Figura 3J es de la construcción hecha en el Ejemplo 25, que incorpora estas diferencias de la secuencia de la construcción del Ejemplo 24.

- 50

Ejemplo 26: Expresión y purificación de homodímero e híbrido de monómero-dímero de EPO-Fc

Células DG44 se sembraron en placas de Petri de cultivo de tejido de 100 mm y se cultivaron a una confluencia del 50%-60%. Un total de 10 µg de ADN se usó para transfectar una placa de 100 mm: para la transfección del homodímero 10 µg de pED.dC.EPO-Fc; para la transfección del híbrido de monómero-dímero 8 µg de pED.dC.EPO-Fc + 2 µg de pcDNA3-Flag-Fc. Las construcciones usadas se clonaron como se describe en el Ejemplo 24. El procedimiento de clonación descrito en el Ejemplo 25 también podría usarse para obtener construcciones para su uso en este ejemplo. Las células se transfectaron como se describe en el manual del reactivo de transfección Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Alternativamente, pED.dC.EPO-Fc se cotransfectó con pSYN-Fc-016 para preparar un monómero sin marcar. El medio se eliminó de la transfección después de 48 horas y se sustituyó con MEM Alfa sin nucleósidos más 5% de suero bovino fetal dializado para ambas transfecciones, mientras que la transfección del híbrido de monómero-dímero también se complementó con 0,2 mg/ml de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 3 días, las células se liberaron de la placa con 0,25% de tripsina y se transfirieron a matraces de cultivo de tejido T25, y la selección continuó durante 10-14 días hasta que las células empezaron a crecer bien a medida que se establecieron líneas celulares estables. La expresión de proteína se amplificó posteriormente mediante la adición de metrotrexato.

Para ambas líneas celulares, aproximadamente 2×10^7 células se usaron para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella rotatoria de 1700 cm² (Corning, Coming, NY). Las botellas rotatorias se incubaron en 5% de CO₂ a 37 °C durante aproximadamente 72 horas. El medio de crecimiento se intercambiaba con 300 ml de medio de producción libre de suero (DMEM/F12 con 5 µg/ml de insulina bovina y 10 µg/ml de gentamicina). El medio de producción (medio acondicionado) se recogió cada día durante 10 días y se guardó a 4 °C. Se añadió medio de producción fresco a las botellas rotatorias después de cada recogida y las botellas se devolvieron a la estufa de incubación. Antes de la cromatografía, el medio se clarificó usando un filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 µm) de Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Todas las siguientes etapas se realizaron a 4 °C. El medio clarificado se aplicó a proteína A-Sepharose, se lavó con 5 volúmenes de columna de 1X PBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM), se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,7, y luego se neutralizó con 1/10 volumen de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. La proteína se dializó entonces en PBS.

La muestra de proteína de transfección del híbrido de monómero-dímero se sometió a más purificación, ya que contuvo una mezcla de homodímero de EPO-Fc:EPO-Fc, híbrido de monómero-dímero EPO-Fc:Flag-Fc y homodímero de Flag-Fc:Flag-Fc. El material se concentró y se aplicó a una columna de 2,6 cm x 60 cm (318 ml) Superdex 200 Prep Grade a una velocidad de flujo de 4 ml/min (36 cm/hora) y luego se eluyó con 3 volúmenes de columna de 1X PBS. Las fracciones correspondientes a dos picos en el detector de UV se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones del primer pico contuvieron tanto homodímero de EPO-Fc:EPO-Fc como híbrido de monómero-dímero de EPO-Fc:Flag-Fc, mientras que el segundo pico contuvo homodímero de Flag-Fc:Flag-Fc. Todas las fracciones que contienen el híbrido de monómero-dímero, pero no el homodímero de Flag-Fc, se reunieron y se aplicaron directamente a una columna de Sepharose 1,6 x 5 cm M2 anti-FLAG (Sigma Corp.) a una velocidad de flujo lineal de 60 cm/hora. Después de la carga la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de PBS. Los híbridos de monómero-dímero se eluyeron entonces con glicina 100 mM, pH 3,0. Las fracciones de elución que contenían el pico de proteína se neutralizaron entonces añadiendo 1/10 volumen de Tris-HCl 1 M, y se analizaron por SDS-PAGE reductora y no reductora. Las fracciones se dializaron en PBS, se concentraron a 1-5 mg/ml y se guardaron a -80 °C.

Alternativamente, las fracciones del primer pico de Superdex 200 se analizaron por SDS-PAGE, y solo fracciones que contenían una mayoría de híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc, con una minoría de homodímero de Epo-Fc, se reunieron. Este conjunto, enriquecido para el híbrido de monómero-dímero, se volvió a aplicar a una columna Superdex 200 y luego se reunieron las fracciones que contenían solo híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc, se dializaron y se guardaron como proteína purificada. Obsérvese que este procedimiento de purificación alternativo también podría usarse para purificar híbridos de monómero-dímero no marcados.

Ejemplo 27: Administración de dímero e híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc con un ligante de ocho aminoácidos a monos cinomolgos

Para administración pulmonar, aerosoles de tanto proteínas del dímero de Epo-Fc como del híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc (ambas con el ligante de 8 aminoácidos) en PBS, pH 7,4 se crearon con el nebulizador Aeroneb Pro™ (AeroGen, Mountain View, CA), en línea con un respirador de Bird Mark 7A, y se administraron a monos cinomolgos sin tratamiento previo anestesiados mediante tubos endotraqueales (que se aproximan a la respiración tidal normal). Ambas proteínas también se administraron a monos cinomolgos sin tratamiento previo mediante inyección intravenosa. Las muestras se tomaron en diversos momentos de tiempo, y la cantidad de proteína que contiene Epo en el plasma resultante se cuantificó usando Quantikine IVD Human Epo Immunoassay (R&D Systems, Mineápolis, MN). Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando el software WinNonLin. La Tabla 4 presenta los resultados de biodisponibilidad de monos cinomolgos tratados con el híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc o el dímero de Epo-Fc.

TABLA 4: ADMINISTRACIÓN DEL HÍBRIDO DE MONÓMERO-DÍMERO DE EPO-FC Y DÍMERO DE EPO-FC A MONOS

Proteína	Mono nº	Vía	Dosis depositada aprox. ¹ (µg/kg)	C _{máx} (ng/ml)	C _{máx} (fmol/ml)	t _{1/2} (h)	t _{1/2} prom (h)
Híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc	CO6181	pulm	20	72,3	1014	23,6	25,2
	CO6214	pulm	20	50,1	703	23,5	
	CO7300	pulm	20	120	1684	36,2	
	CO7332	pulm	20	100	1403	17,5	
	CO7285	IV	25	749	10508	21,3	22,6
	CO7288	IV	25	566	7941	23	
	CO7343	IV	25	551	1014	23,5	
Dímero de Epo-Fc	DD026	pulm	15	10,7	120	11,5	22,1
	DD062	pulm	15	21,8	244	27,3	
	DD046	pulm	15	6,4	72	21,8	
	DD015	pulm	15	12,8	143	20,9	
	DD038	pulm	35	27	302	29	
	F4921	IV	150	3701	41454	15,1	14,6
	96Z002	IV	150	3680	41219	15,3	
	1261CQ	IV	150	2726	30533	23,6	
	127-107	IV	150	4230	47379	15,0	
	118-22	IV	150	4500	50403	8,7	
	126-60	IV	150	3531	39550	9,8	

¹Basado en el 15% de fracción de deposición de dosis nebulizada como se ha determinado por escintigrafía gamma

El porcentaje de biodisponibilidad (F) se calculó para la dosis pulmonar usando la siguiente ecuación:

$$F = (\text{ABC pulmonar} / \text{Dosis pulmonar}) / (\text{ABC IV} / \text{Dosis IV}) * 100$$

TABLA 5: CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE BIODISPONIBILIDAD PARA HÍBRIDO DE MONÓMERO-DÍMERO FRENTE A DÍMERO DE EPO-FC DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN PULMONAR A MONOS CINOMOLGOS SIN TRATAMIENTO PREVIO

Proteína	Mono nº	Dosis depositada aprox. ¹ (µg/kg)	ABC ng·h/ml	Biodisponibilidad ² (F)	Biodisponibilidad promedio
Híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc	CO6181	20 µg/kg	3810	25,2%	34,9%
	CO6214	20 µg/kg	3072	20,3%	
	CO7300	20 µg/kg	9525	63,0%	
	CO7332	20 µg/kg	4708	31,1%	
Dímero de Epo-Fc	DD026	15 µg/kg	361	5,1%	10,0%
	DD062	15 µg/kg	1392	19,6%	
	DD046	15 µg/kg	267	3,8%	
	DD015	15 µg/kg	647	9,1%	
	DD038	35 µg/kg	2062	12,4%	

¹ Basado en el 15% de fracción de deposición de dosis nebulizada como se ha determinado por escintigrafía gamma ² ABC media para híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc IV = 18,913 ng·h/ml (n=3 monos), dosificado a 25 µg/kg. ABC media para dímero de Epo-Fc IV = 70,967 ng·h/ml (n=6 monos), dosificado a 150 µg/kg

5 La farmacocinética de Epo-Fc con un ligante de 8 aminoácidos administrada a monos cinomolgos se presenta en la Figura 11. La Figura compara el dímero de Epo-Fc con el híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc en monos después de la administración de una única dosis pulmonar. Basándose en una comparación molar, se obtuvieron niveles en suero significativamente grandes en monos tratados con el híbrido de monómero-dímero en comparación con el dímero.

10 **Ejemplo 28: Administración subcutánea de híbrido de monómero-dímero de EPO-Fc**

Para comparar concentraciones en suero de agentes de eritropoyetina conocidos con híbridos de monómero-dímero de EPO-Fc, tanto el híbrido de monómero-dímero de EPO-Fc como Aranesp[®] (darbepoyetina alfa), que no es una proteína química de fusión, se administraron subcutáneamente a diferentes monos y la concentración en suero de ambos se midió con el tiempo.

15 Se inyectaron subcutáneamente monos cinomolgos (n = 3 por grupo) con 0,025 mg/kg de híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc. Las muestras de sangre se recogieron antes de la dosis y en momento de hasta 144 horas después de la dosis. Se preparó suero a partir de la sangre y se guardó congelado hasta el análisis por ELISA (Human Epo Quantikine Immunoassay) (R & D Systems, Mineápolis, MN). Los parámetros farmacocinéticos se determinaron usando el software WinNonLin[®] (Pharsight, Mountainview, CA).

20 Los resultados indicaron que las concentraciones en suero de tanto el híbrido de monómero-dímero de EPO-Fc como Aranesp[®] (darbepoyetina alfa) fueron equivalentes con el tiempo, aun cuando la dosis molar administrada de Aranesp[®] (darbepoyetina alfa) fuera ligeramente mayor (Tabla 6) (Figura 12).

TABLA 6

	Vía	Dosis (µg/kg)	Dosis (nmol/kg)	C _{máx} (ng/ml)	ABC (ng·h·ml ⁻¹)	T _{1/2} (h)	% de biodisponibilidad (F)
Híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc	Subcutánea	25	0,3	133 ± 34	10,745 ± 3,144	26 ± 5	57 ± 17
Aranesp [®]	Subcutánea	20	0,54	83±11	5390 ± 747	22 ± 2	53 ± 8

25 **Ejemplo 29: Administración intravenosa de híbrido de monómero-dímero de EPO-Fc**

Para comparar concentraciones en suero de agentes de eritropoyetina conocidos con híbridos de monómero-dímero

de EPO-Fc, el híbrido de monómero-dímero de EPO-Fc, Aranesp[®] (darbepoyetina alfa) y Epogen[®] (epoyetina alfa), ninguno de los cuales es una proteína quimérica de fusión, se administraron intravenosamente a diferentes monos y la concentración en suero de ambas se midió con el tiempo.

5 Se inyectaron subcutáneamente monos cinomolgos (n = 3 por grupo) con 0,025 mg/kg de híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc. Las muestras de sangre se recogieron antes de la dosis y en momento de hasta 144 horas después de la dosis. Se preparó suero a partir de la sangre y se guardó congelado hasta el análisis por ELISA (Human Epo Quantikine Immunoassay) (R & D Systems, Mineápolis, MN). Los parámetros farmacocinéticos se determinaron usando el software WinNonLin[®] (Pharsight, Mountainview, CA).

10 Los resultados indicaron que la concentración en suero frente al tiempo (ABC) de híbrido de monómero-dímero de EPO-Fc fue superior a las concentraciones de tanto Epogen[®] (epoyetina alfa) como Aranesp[®] (darbepoyetina alfa), aun cuando los monos recibieron dosis molares mayores de tanto Epogen[®] (epoyetina alfa) como Aranesp[®] (darbepoyetina alfa) (Tabla 7) (Figura 13).

TABLA 7

	Vía	Dosis (µg/kg)	Dosis (nmol/kg)	C _{máx} (ng/ml)	ABC (ng·h·ml ⁻¹)	T _{1/2} (h)
Híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc	Intravenosa	25	0,3	622 ± 110	18,913 ± 3,022	23 ± 1
Aranesp [®]	Intravenosa	20	0,54	521 ± 8	10,219 ± 298	20 ± 1
Epogen	Intravenosa	20	0,66	514 ± 172	3936 ± 636	6,3 ± 0,6

15 **Ejemplo 30: Purificación alternativa de híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc**

Todavía otra alternativa para purificar EPO-Fc se describe en la presente memoria. Una mezcla que contiene Fc, híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc y dímero de Epo-Fc se aplicó a una columna de proteína A-Sepharose (Amersham, Uppsala, Suecia). La mezcla se eluyó según las instrucciones del fabricante. El eluato de proteína A-Sepharose, que contiene la mezcla, se intercambió con tampón Tris-Cl 50 mM (pH 8,0). La mezcla de proteínas se cargó sobre una columna de 8 ml Mimetic Red 2 XL (ProMetic Life Sciences, Inc., Wayne, NJ) que se había equilibrado en Tris-Cl 50 mM (pH 8,0). La columna se lavó entonces con Tris-Cl 50 mM (pH 8,0); NaCl 50 mM. Esta etapa eliminó la mayoría del Fc. El híbrido de monómero-dímero de EpoFc se eluyó específicamente de la columna con Tris-Cl 50 mM (pH 8,0); NaCl 400 mM. El dímero de Epo-Fc puede eluirse y la columna se regeneró con 5 volúmenes de columna de NaOH 1 M. Las fracciones eluidas de la columna se analizaron por SDS-PAGE (Figura 14).

25 **Ejemplo 31: Clonación de la construcción de secuencia señal de Igk - Fc para la preparación de Fc sin marcar solo.**

La secuencia codificante para la región constante de IgG1 (EU n° 221-447; región Fc) se obtuvo por amplificación por PCR de una biblioteca de ADNc de leucocitos (Clontech, CA) usando los siguientes cebadores:

rcFc-F 5'- GCTGCGGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCTCC GGAACCTCTGGGCGGAC-CGTCAGTC -3' (SEQ ID NO: 84)

30 rcFc-R 5'- ATTGGAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC -3' (SEQ ID NO: 85)

El cebador directo añade tres aminoácidos (AAV) y un sitio de clonación Sall antes de empezar la región Fc, y también incorpora un sitio de restricción BspEI en los aminoácidos 231-233 y un sitio de restricción RsrII en los aminoácidos 236-238 usando la degeneración del código genético para preservar la correcta secuencia de aminoácidos (numeración EU). El cebador inverso añade un sitio de clonación de EcoRI después del codón de terminación del Fc. Se llevó a cabo una reacción de PCR de 25 µl con 25 pmoles de cada cebador usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos), 72 °C 10 minutos. La banda de tamaño esperado (~696 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA) y se clonó en pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) para producir un plásmido intermedio pSYN-Fc-001 (pGEM T-Easy/Fc).

40 La secuencia señal de Igk de ratón se añadió a CDS de Fc usando los siguientes cebadores:

Seq señal de rc-Igk-F: 5'-TTTAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACTCC
TGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGTTCCAGTTCCACTGGTGACAAAAC CACACATGCCACCG -3' (SEQ ID
NO: 86)

Fc-noXma-GS-R: 5'-GGTCAGCTCATCGCGGGATGGG -3' (SEQ ID NO: 87)

5 Fc-noXma-GS-F: 5'-CCCATCCCGCGATGAGCTGACC -3' (SEQ ID NO: 88)

El cebador rc-secuencia señal de Igk-F añade un sitio de restricción HindIII al extremo 5' de la molécula, seguido de una secuencia de Kozak (GCCGCCACC) (SEQ ID N°: 89), seguido de la secuencia señal de la cadena ligera de Igk de ratón, directamente contigua al principio de la secuencia de Fc (EU n° 221). Los cebadores Fc-noXma-GS-F y -R eliminan el sitio XmaI interno de la secuencia de Fc codificante, usando la degeneración del código genético para preservar la correcta secuencia de aminoácidos. Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR de 25 µl con 25 pmoles de tanto rc-secuencia señal de Igk-F como Fc-noXma-GS-R o Fc-noXma-GS-F y rcFc-R usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ. La primera reacción se llevó a cabo con 500 ng de biblioteca de ADNc de leucocitos (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) como molde usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos), 72 °C 10 minutos. La segunda reacción se llevó a cabo con 500 ng de pSYN-Fc-001 como molde (anteriormente) usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 16 ciclos de (94 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos), 72 °C 10 minutos. Las bandas de tamaño esperado (~495 y 299 pb, respectivamente) se purificaron en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA), luego se combinaron en una reacción de PCR con 25 pmoles de cebadores de secuencia señal de rc-Igk-F y rcFc-R y se ejecutaron como antes, hibridando a 58 °C y continuando durante 16 ciclos. La banda de tamaño esperado (~772 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA) y se clonó en pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) para producir un plásmido intermedio pSYN-Fc-007 (pGEM T-Easy/sec señal de Igk-Fc). El casete de la secuencia señal de Igk-Fc entero se subclonó entonces usando los sitios HindIII y EcoRI en tanto el vector de expresión de mamífero pEE6.4 (Lonza, Slough, RU) como pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), dependiendo del sistema que fuera a usarse, para generar pSYN-Fc-009 (pEE6.4/sec señal de Igk-Fc) y pSYN-Fc-015 (pcDNA3/sec señal de Igk-Fc).

Ejemplo 32: Clonación de la construcción de secuencia señal de Igk - Fc N297A para la preparación de Fc N297A sin marcar solo

Con el fin de mutar Asn 297 (numeración EU) de Fc a un residuo de Ala se usaron los siguientes cebadores:

30 N297A-F 5'-GAGCAGTACGCTAGCACGTACCG -3' (SEQ ID N°: 90)

N297A-R 5'-GGTACGTGCTAGCTACTGCTCC -3' (SEQ ID N°: 91)

Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR con 25 pmoles de tanto la rc-secuencia señal de Igk-F y N297A-R o N297A-F y rcFc-R usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ. Ambas reacciones se llevaron a cabo usando 500 ng de pSYN-Fc-007 como molde usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 16 ciclos de (94 °C 30 segundos, 48 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos), 72 °C 10 minutos. Las bandas de tamaño esperado (~319 y 475 pb, respectivamente) se purificaron en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA), luego se combinaron en una reacción de PCR con 25 pmoles de cebadores de rc-secuencia señal de Igk-F y rcFc-R y se ejecutaron como antes, hibridando a 58 °C y continuando durante 16 ciclos. La banda de tamaño esperado (~772 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA) y se clonó en pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) para producir un plásmido intermedio pSYN-Fc-008 (pGEM T-Easy/sec señal de Igk-Fc N297A). El casete de la secuencia señal de Igk-Fc entero solo se subclonó entonces usando los sitios HindIII y EcoRI en tanto el vector de expresión de mamífero pEE6.4 (Lonza, Slough, RU) como pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), dependiendo del sistema que fuera a usarse, para generar pSYN-Fc-010 (pEE6.4/sec señal de Igk-Fc N297A) y pSYN-Fc-016 (pcDNA3/sec señal de Igk-Fc N297A).

Estos mismos cebadores de N297A también se usaron con cebadores de rcFc-F y rcFc-R y pSYN-Fc-001 como molde en una reacción de PCR seguido de subclonación como se indica anteriormente para generar pSYN-Fc-002 (pGEM T Easy/Fc N297A).

Ejemplo 33: Clonación de Epo-Fc y Fc en un único plásmido para vectores de doble gen para la preparación de híbridos de monómero-dímero no mutante de Epo-Fc o N297A, y expresión

Una alternativa a transfectar las construcciones de Epo-Fc y Fc en plásmidos separados es clonarlos en un único plásmido, también llamado un vector de doble gen, tal como el usado en el sistema de Lonza Biologics (Slough, RU). El fragmento RsrII/EcoRI de pSYN-Fc-002 se subclonó en los sitios correspondientes en pEE12.4 (Lonza Biologics, Slough, RU) según procedimientos convencionales para generar pSYN-Fc-006 (fragmento pEE12.4/Fc N297A). El plásmido pSYN-EPO-004 se usó como molde para una reacción de PCR usando el cebador de Epo-F del Ejemplo 25 y el siguiente cebador:

EpoRsr-R: 5'-CTGACGGTCCGCCCCAGGAGTTCCG GAGCTGGGCACGGTGGGCATG TGTGAGTTTTGTCGAC-CGCAGCGG -3' (SEQ ID NO: 91)

5 Se llevó a cabo una reacción de PCR usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ como se indica anteriormente, durante 16 ciclos con 55 °C de temperatura de hibridación. La banda de tamaño esperado (~689 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA) y se clonó en pSYN-Fc-006 usando los sitios de restricción HindIII/RsrII, para generar pSYN-EPO-005 (pEE12.4/Epo-Fc N297A). El gen de doble vector para el híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc N297A se construyó entonces clonando el fragmento NotI/BamHI de pSYN-Fc-010 en los sitios correspondientes en pSYN-EPO-005 para generar pSYN-EPO-008 (pEE12.4-6.4/Epo-Fc N297A/Fc N297A).

10 La construcción no mutante también se hizo subclonando la secuencia de Fc no mutante de pSYN-Fc-001 en pSYN-EPO-005 usando los sitios RsrII y EcoRI, para generar pSYN-EPO-006 (pEE12.4/Epo-Fc). El gen de doble vector para el híbrido de monómero-dímero de Epo-Fc se construyó entonces clonando el fragmento NotI/BamHI de pSYN-Fc-009 en los sitios correspondientes en pSYN-EPO-006 para generar pSYN-EPO-007 (pEE1.2.4-6.4/Epo-Fc /Fc).

15 Cada plásmido se transfeció en células CHOK1SV y clones positivos se identificaron y adaptaron a suspensión libre de suero, como se indica en The Lonza Biologics Manual for Standard Operating procedures (Lonza Biologics, Slough, RU), y se purificó como se indica para las otras construcciones de monómero-dímero.

Ejemplo 34: Clonación de IFN β -Fc humano, IFN β -Fc N297A con ligantes de ocho aminoácidos y construcciones de Igk-Fc-6His

20 Se usaron 10 ng de una biblioteca de ADN genómico humano de Clontech (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) como molde para aislar IFN β humano con su secuencia señal nativa usando los siguientes cebadores:

IFN β -F H3/Sbfl:

5'-CTAGCCTGCAGGAAGCTTGCCGCCACCATGACCA
ACAAGTGTCTCCTC -3' (SEC ID N°: 92)

IFN β -R (EFAG) Sal:

5'TTTGTGCGACCGCAGCGGCGCCGGCGAACTCGTTTCGG
AGGTAACCTGTAAG -3' (SEC ID N°: 93)

25 El cebador inverso también se usó para crear una secuencia de ligante de ocho aminoácidos (EFAGAAAV) (SEQ ID N°: 94) en el extremo 3' de la secuencia de IFN β humano. La reacción de PCR se llevó a cabo usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico Rapid Cyclor (Idaho Technology, Salt Lake City, UT). Un producto de PCR del tamaño correcto (~607 pb) se purificó en gel usando un kit de extracción en gel (Qiagen; Valencia, CA), se clonó en el vector de clonación TA (Promega, Madison, WI) y se secuenció. Esta construcción se llamó pSYN-IFN β -002. pSYN-IFN β -002 se digirió con Sbfl y Sall y se clonó en pSP72 (Promega) en los sitios PstI y Sall dando pSYN-IFN β -005.

30 pSYN-Fc-001 purificado (0,6 μ g) se digirió con Sall y EcoRI y se clonó en los sitios correspondientes de pSYN-IFN β -005 para crear el plásmido pSYN-IFN β -006 que contiene IFN β humano ligado a Fc humano mediante una secuencia de ligante de ocho aminoácidos. pSYN-IFN β -006 se digirió entonces con Sbfl y EcoRI y la secuencia de IFN β -Fc de longitud completa se clonó en los sitios PstI y EcoRI de pEDdC.señal para crear el plásmido pSYN-IFN β -008.

35 pSYN-Fc-002 que contenía el ADN de Fc humano con un único cambio de aminoácido de asparagina a alanina en la posición 297 (N297A; numeración EU) se digirió con BspEI y XmaI para aislar un fragmento de ADN de ~365 pb que contenía la mutación N297A. Este fragmento de ADN se clonó en los sitios correspondientes en pSYN-IFN β -008 para crear el plásmido pSYN-IFN β -009 que contenía la secuencia de IFN β -Fc con un ligante de ocho aminoácidos y una mutación N297A en Fc en el vector de expresión, pED.dC.

40 Clonación de la secuencia señal de Igk-Fc N297A - 6His. Se usaron los siguientes cebadores para añadir una marca de 6xHis al extremo C de la secuencia codificante de Fc N297A:

Fc GS-F: 5'-GGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACTCC -3' (SEQ ID N°: 95)

Fc.6His-R: 5'-TCAGTGGTGATGGTGATGATGTTTACCCGGAGACAGGGAG -3' (SEQ ID N°: 96)

Fc.6His-F: 5'- GGTAACATCATCACCATCACCCTGAGAATTCC

AATATCACTAGTGAATTCCG -3' (SEC ID Nº: 97)

Sp6+T-R: 5'- GCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGC -3' (SEQ ID Nº: 98)

Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR con 50 pmoles de tanto Fc GS-F y Fc.6His-R como Fc.6His-F y Sp6+T-R usando el sistema Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) según el protocolo convencional del fabricante en un ciclador térmico MJ. Ambas reacciones se llevaron a cabo usando 500 ng de pSYN-Fc-008 como molde en una reacción de 50 µl usando condiciones de ciclado convencionales. Las bandas de tamaño esperado (~780 y 138 pb, respectivamente) se purificaron en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA), luego se combinaron en una reacción de PCR de 50 µl con 50 pmoles de cebadores Fc GS-F y Sp6+T-R y se ejecutaron como antes, usando condiciones de ciclos convencionales. La banda de tamaño esperado (~891 pb) se purificó en gel con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia CA) y se clonó en pcDNA6 V5-His B usando los sitios HindIII y EcoRI para generar pSYN-Fc-014 (pcDNA6/sec señal de Igg-Fc N297A-6 His).

Ejemplo 35: Expresión y purificación del homodímero IFNβ-Fc, IFNβ-Fc N297A e híbrido de monómero-dímero de IFNβ-Fc N297A

Se sembraron células CHO DG44 en placas de cultivo de tejido de 100 mm y se cultivaron a una confluencia del 50%-60%. Se usó un total de 10 µg de ADN para transfectar una única placa de 100 mm. Para la transfección del homodímero se usaron 10 µg de la construcción de pSYN-FNβ-008 o pSYN-IFNβ-009; para la transfección del híbrido de monómero-dímero se usaron 8 µg de construcción de pSYN-IFNβ-009 + 2 µg de pSYN-Fc-014. Las células se transfectaron usando reactivos de transfección Superfect (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. 48 a 72 horas después de la transfección, el medio de crecimiento se eliminó y las células se liberaron de las placas con 0,25% de tripsina y se transfirieron a matraces de cultivo de tejido T75 en medio de selección (MEM Alfa sin nucleósidos más 5% de suero bovino fetal dializado). El medio de selección para la transfección del híbrido de monómero-dímero se complementó con 5 µg/ml de blastidina (Invitrogen, Carlsbad, CA). La selección continuó durante 10-14 días hasta que las células empezaron a cultivarse bien y se establecieron líneas celulares estables. La expresión de proteína se amplificó posteriormente mediante la adición de metrotrexato: que oscila de 10 a 50 nM.

Para todas las líneas celulares, aproximadamente 2×10^7 células se usaron para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella rotatoria de 1700 cm² (Corning, Corning, NY). Las botellas rotatorias se incubaron en una estufa de incubación con 5% de CO₂ a 37 °C durante aproximadamente 72 horas. El medio de crecimiento se intercambiaba entonces con 300 ml de medio de producción libre de suero (DMEM/F12 con 5 µg/ml de insulina humana). El medio de producción (medio acondicionado) se recogió cada día durante 10 días y se guardó a 4 °C. Se añadió medio de producción fresco a las botellas rotatorias después de cada recogida y las botellas se devolvieron a la estufa de incubación. Antes de la cromatografía, el medio se clarificó usando un filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 µm) de Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Todas las siguientes etapas se realizaron a 4 °C. El medio clarificado se aplicó a proteína A-Sepharose, se lavó con 5 volúmenes de columna de 1X PBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM), se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,7, y luego se neutralizó con 1/10 volumen de Tris-HCl 1 M a pH 8,0, NaCl 5 M. Las proteínas homodímeras se purificaron adicionalmente sobre una columna de exclusión Superdex 200 Prep Grade, se ejecutaron y se eluyeron en fosfato de sodio 50 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM, 10% de glicerol.

La proteína de híbrido de monómero-dímero se sometió a más purificación ya que contuvo una mezcla de homodímero de IFNβ-Fc N297A:IFNβ-Fc N297A, híbrido de monómero-dímero de IFNβ-Fc N297A: Fc N297A His y homodímero de Fc N297A His: Fc N297A His. El material se aplicó a una columna quelante de níquel en fosfato de sodio 50 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM. Después de la carga, la columna se lavó con imidazol 50 mM en fosfato de sodio 50 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM y la proteína se eluyó con un gradiente de imidazol 50 - 500 mM en fosfato de sodio 50 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM. Las fracciones correspondientes a los picos de elución en un detector de UV se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones del primer pico contuvieron híbrido de monómero-dímero de IFNβ-Fc N297A: Fc N297A His, mientras que el segundo pico contuvo homodímero de Fc N297A His: Fc N297A His. Todas las fracciones que contienen el híbrido de monómero-dímero, pero no el homodímero de Fc, se reunieron y se aplicaron directamente a una columna de exclusión Superdex 200 Prep Grade, se ejecutaron y se eluyeron en fosfato de sodio 50 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM, 10% de glicerol. Las fracciones que contienen híbridos de monómero-dímero de IFNβ-Fc N297A:Fc N297A His se reunieron y se guardaron a -80 °C.

Ejemplo 36: Ensayo antiviral para actividad de IFNβ

La actividad antiviral (UI/ml) de proteínas de fusión de IFNβ se determinó usando un ensayo de CPE (efecto citopático). Se sembraron células A549 en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos en medio de crecimiento (RPMI 1640 complementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y L-glutamina 2 mM) durante 2 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Los patrones de IFNβ y las proteínas de fusión de IFNβ se diluyeron en medio de crecimiento y se añadieron a células por triplicado durante 20 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Tras la incubación, todos los medios se eliminaron de los pocillos, el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) se diluyó en medio de crecimiento y se añadió

(3000 ufp/pocillo) a cada pocillo con la excepción de los pocillos de control. Las placas se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ durante 28 horas. Las células vivas se fijaron con 10% de ácido tricloroacético (TCA) frío y luego se tiñeron con sulforrodamina B (SRB) según protocolos publicados (Rubinstein y col. 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82, 1113). El colorante SRB se solubilizó con Tris 10 mM a pH 10,5 y se leyó en un espectrofotómetro a 490 nm. Las muestras se analizaron comparando actividades con una curva patrón conocida que oscila de 10 a 0,199 UI/ml. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 8 y demuestran elevada actividad antiviral de híbridos de monómero-dímero.

TABLA 8: ENSAYO ANTIVIRAL DE INTERFERÓN BETA**HOMODÍMERO FRENTE A HÍBRIDO DE MONÓMERO-DÍMERO**

Proteína	Actividad antiviral (UI/nmol)	Desv est
Homodímero del ligante de 8 aa de IFN β -Fc	4,5 × 10 ⁵	0,72 × 10 ⁵
Homodímero del ligante de 8 aa de IFN β -Fc N297A	3,21 × 10 ⁵	0,48 × 10 ⁵
Híbrido de monómero-dímero del ligante de 8 aa de IFN β -Fc N297A: Fc-His	12,2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵

Ejemplo 37: Administración de homodímero e híbrido de monómero-dímero de IFN β -Fc con un ligante de ocho aminoácidos a monos cinomolgos

Para administración pulmonar, aerosoles de tanto proteínas de homodímero de IFN β -Fc como de híbrido de monómero-dímero de IFN β -Fc N297A (ambas con el ligante de 8 aminoácidos) en PBS, pH 7,4, 0,25% de HSA, se crearon con el nebulizador Aeroneb Pro™ (AeroGen, Mountain View, CA), en línea con un respirador Bird Mark 7A, y se administraron a monos cinomolgos sin tratamiento previo anestesiados mediante tubos endotraqueales (que se aproximan a la respiración tidal normal). Se tomaron muestras de sangre en diversos momentos de tiempo, y la cantidad de proteína que contiene IFN β en el suero resultante se cuantificó usando un inmunoensayo de IFN β humano (Biosource International, Camarillo, CA). Se calcularon los parámetros farmacocinéticos usando el software WinNonLin. La Tabla 9 presenta los resultados de monos cinomolgos tratados con el híbrido de monómero-dímero de IFN β -Fc N297A u homodímero de IFN β -Fc.

TABLA 9: ADMINISTRACIÓN DE HÍBRIDO DE MONÓMERO-DÍMERO DE IFN β FC N297A Y HOMODÍMERO DE IFN β FC A MONOS

Proteína	Mono n°	Vía	Dosis depositada aprox. ¹ (μg/kg)	C _{máx} (ng/ml)	ABC (h*ng/ml)	t _{1/2} (h)	t _{1/2} prom (h)
Híbrido de monómero-dímero de IFN β -Fc N297A	CO7308	pulm	20	23,3	987,9	27,6	27,1
	CO7336	pulm	20	22,4	970,6	25,6	
	CO7312	pulm	20	21,2	1002,7	28,0	
Homodímero de IFN β -Fc	CO7326	pulm	20	2,6	94,6	11,1	11,4
	CO7338	pulm	20	5,0	150,6	11,7	

¹ Basado en el 15% de fracción de deposición de dosis nebulizada como se ha determinado por escintigrafía gamma

La farmacocinética de IFN β -Fc con un ligante de 8 aminoácidos administrada a monos cinomolgos se presenta en la Figura 15. La figura compara el homodímero de IFN β -Fc con el híbrido de monómero-dímero de IFN β -Fc N297A en monos después de la administración de una única dosis pulmonar. Se obtuvieron niveles en suero significativamente mayores en monos tratados con el híbrido de monómero-dímero en comparación con el homodímero.

También se analizaron muestras de suero para niveles de neopterina (un biomarcador de actividad de IFN β) usando un inmunoensayo de neopterina (MP Biomedicals, Orangeburg, NY). Los resultados para este análisis se muestran en la Figura 16. La figura compara la estimulación de neopterina en respuesta al homodímero de IFN β -Fc y el híbrido de monómero-dímero de IFN β -Fc N297A. Puede observarse que se detectaron niveles de neopterina significativamente mayores en monos tratados con híbrido de monómero-dímero de IFN β -Fc N297A con respecto al homodímero de IFN β -Fc.

Todos los números que expresan cantidades de componentes, condiciones de reacción, etc., usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones deben entenderse como que están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en

la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que buscan obtenerse por la presente invención. Como mínimo, y no como un intento por limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse en vista del número de dígitos significativos y aproximación de redondeo normales.

- 5 Las realizaciones específicas en la presente memoria se describen ofrecidas a modo de ejemplo solo y no pretenden ser limitantes de ningún modo.

Ejemplos preferidos de la presente descripción se describen a continuación y se refieren como casos E1-E194.

- 10 E1. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en donde dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa, y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y

en donde dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y una molécula biológicamente activa o región variable de inmunoglobulina.

E2. La proteína quimérica de E1, en donde dicha segunda cadena además comprende una marca de afinidad.

E3. La proteína quimérica de E2, en donde la marca de afinidad es una marca FLAG.

- 15 E4. La proteína quimérica de E1, en donde la parte de una inmunoglobulina es un fragmento de Fc.

E5. La proteína quimérica de E4, en donde la parte de una inmunoglobulina es un componente de unión de FcRn.

E6. La proteína quimérica de E5, en donde el componente de unión de FcRn es un péptico mimético de un fragmento Fc de una inmunoglobulina.

E7. La proteína quimérica de E1 o 5, en donde la inmunoglobulina es IgG.

- 20 E8. La proteína quimérica de E1 o 5, en donde la molécula biológicamente activa es un polipéptido.

E9. La proteína quimérica de E7, en donde la IgG es una IgG1 o una IgG2.

E10. La proteína quimérica de E1 o 5, en donde la molécula biológicamente activa es un inhibidor de la fusión viral.

E11. La proteína quimérica de E10, en donde el inhibidor de la fusión viral es un inhibidor de la fusión HIV.

- 25 E12. La proteína quimérica de E11, en donde el inhibidor de la fusión HIV es T20 (SEQ ID NO:1), T21 (SEQ ID NO:2), o T1249 (SEQ ID NO:3).

E13. La proteína quimérica de E1 o 5, en donde la molécula biológicamente activa es un factor de coagulación.

E14. La proteína quimérica de E13, en donde el factor de coagulación es Factor VII o VIIa.

E15. La proteína quimérica de E13, en donde el factor de coagulación es Factor IX.

E16. La proteína quimérica de E1 o 5, en donde la molécula biológicamente activa es una molécula pequeña.

- 30 E17. La proteína quimérica de E16, en donde la molécula biológicamente activa es leuprolida.

E18. La proteína quimérica de E1 o 5, en donde la molécula biológicamente activa es interferón.

E19. La proteína quimérica de E18, en donde el interferón es interferón α y tiene un ligante de 15-25 aminoácidos.

E20. La proteína quimérica de E19, en donde el interferón α tiene un ligante de 15-20 aminoácidos.

E21. La proteína quimérica de E1 o 5, en donde la molécula biológicamente activa es un ácido nucleico.

- 35 E22. La proteína quimérica de E21, en donde el ácido nucleico es ADN o ARN.

E23. La proteína quimérica de E21, en donde el ácido nucleico es una molécula antisentido.

E24. La proteína quimérica de E21, en donde el ácido nucleico es una ribozima.

E25. La proteína quimérica de E1 o 5, en donde la molécula biológicamente activa es un factor de crecimiento.

E26. La proteína quimérica de E25, en donde el factor de crecimiento es eritropoyetina.

- 40 E27. La proteína quimérica de E16, en donde molécula pequeña es un antagonista VLA4

E28. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en donde dicha

primera cadena comprende una molécula biológicamente activa, y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y

en donde dicha segunda cadena consiste en al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y opcionalmente una marca de afinidad.

5 E29. La proteína quimérica de E28, en donde la marca de afinidad es una marca FLAG.

E30. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en donde dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa, y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y

10 en donde dicha segunda cadena consiste esencialmente en al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y opcionalmente una marca de afinidad.

E31. La proteína quimérica de E30, en donde la marca de afinidad es una marca FLAG.

E32. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadenas de polipéptidos.

a) en donde dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y un primer dominio que tiene al menos un componente de unión específica, y

15 b) en donde dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una inmunoglobulina sin una molécula biológicamente activa o región variable de inmunoglobulina y que además comprende un segundo dominio que es un componente de unión específica de dicho primer dominio.

E33. La proteína quimérica de E32, en donde dicha segunda cadena además comprende una marca de afinidad.

E34. La proteína quimérica de E33, en donde la marca de afinidad es una marca FLAG.

20 E35. La proteína quimérica de E32, en donde la parte de una inmunoglobulina es un Fragmento de Fc.

E36. La proteína quimérica de E32 o 35, en donde la inmunoglobulina es IgG.

E37. La proteína quimérica de E35, en donde la parte de una inmunoglobulina es un componente de unión de FcRn.

E38. La proteína quimérica de E37, en donde el componente de unión de FcRn es un péptido mimético de un fragmento de Fc de una inmunoglobulina.

25 E39. La proteína quimérica de E32 o 37, en donde el primer dominio se une con el segundo dominio no covalentemente.

E40. La proteína quimérica de E32 o 37, en donde el primer dominio es una mitad de una cremallera de leucina superenrollada y dicho segundo dominio es el componente de unión complementario de dicha cremallera de leucina superenrollada.

30 E41. La proteína quimérica de E32 o 37, en donde la molécula biológicamente activa es un péptido.

E42. La proteína quimérica de E32 o 37, en donde la molécula biológicamente activa es interferón.

E43. La proteína quimérica de E42, en donde el interferón es interferón α y tiene un ligante de 15-25 aminoácidos.

E44. La proteína quimérica de E43, en donde el interferón α tiene un ligante de 15-20 aminoácidos.

E45. La proteína quimérica de E41, en donde la molécula biológicamente activa es feuprolida.

35 E46. La proteína quimérica de E32 o 37, en donde la molécula biológicamente activa es un inhibidor de fusión viral.

E47. La proteína quimérica de E46, en donde el inhibidor de fusión viral es un inhibidor de fusión HIV.

E48. La proteína quimérica de E47, en donde el inhibidor de fusión HIV es T20 (SEQ ID NO:1), o T21 (SEQ ID NO:2), o T1249 (SEQ ID NO:3).

E49. La proteína quimérica de E32 o 37, en donde la molécula biológicamente activa es un factor de coagulación.

40 E50. La proteína quimérica de E49, en donde el factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa.

E51. La proteína quimérica de E49, en donde el factor de coagulación es Factor IX.

E52. La proteína quimérica de E32 o 37, en donde la molécula biológicamente activa es una molécula pequeña.

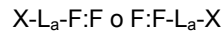
- E53. La proteína quimérica de E52, en donde the molécula pequeña es un antagonista de VLA4.
- E54. La proteína quimérica de E32 o 37, en donde la molécula biológicamente activa comprende un ácido nucleico.
- E55. La proteína quimérica de E54, en donde el ácido nucleico es ADN o ARN.
- E56. La proteína quimérica de E54, en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico antisentido.
- 5 E57. La proteína quimérica de E54, en donde el ácido nucleico es una ribozima.
- E58. La proteína quimérica de E32 o 37, en donde la molécula biológicamente activa es un factor de crecimiento u hormona.
- E59. La proteína quimérica de E58, en donde el factor de crecimiento es eritropoyetina.
- 10 E60. Una composición farmacéutica que comprende la proteína quimérica de E1, 5, 32, o 37 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- E61. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadenas de polipéptidos.
- a) en donde dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y un primer dominio que tiene al menos un componente de unión específica, y
- 15 b) en donde dicha segunda cadena consiste en al menos una parte de una inmunoglobulina, un segundo dominio que es un componente de unión específica de dicho primer dominio y opcionalmente una marca de afinidad.
- E62. La proteína quimérica de E61, en donde la marca de afinidad es una marca FLAG.
- E63. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadenas de polipéptidos.
- a) en donde dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y un primer dominio que tiene al menos un componente de unión específica, y
- 20 b) en donde dicha segunda cadena consiste esencialmente en al menos una parte de una inmunoglobulina, y un segundo dominio que es un componente de unión específica de dicho primer dominio y opcionalmente una marca de afinidad
- E64. La proteína quimérica de E63, en donde la marca de afinidad es una marca FLAG.
- E65. Un método de obtención de una proteína quimérica biológicamente activa que comprende:
- 25 a) transfectar una primera célula con un primer constructo de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica un polipéptido que comprende una molécula biológicamente activa unida de forma operativa a una segunda molécula de ADN que codifica al menos una segunda parte de una región constante de inmunoglobulina.
- b) transfectar una segunda célula con un segundo constructo de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica un polipéptido que comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin una
- 30 molécula biológicamente activa o región variable de una inmunoglobulina);
- c) cultivar la célula de a) y b) en condiciones tales que el polipéptido codificado por dicho primer constructo de ADN y dicho segundo constructo de ADN se expresa; y
- d) aislar los dímeros de a) y b) de dicha célula transfectada.
- E66. El método de E65, en donde dicha porción de una región constante de inmunoglobulina es un componente de
- 35 unión de FcRn.
- E67. El método de E65 o 66, en donde la molécula biológicamente activa es un polipéptido.
- E68. El método de E65 o 66, en donde la molécula biológicamente activa es interferón.
- E69. El método de E68, en donde el interferón es interferón α y tiene un ligante of 15-25 aminoácidos.
- E70. El método de E69, en donde el interferón α tiene un ligante of 15-20 aminoácidos.
- 40 E71. El método de E65 o 66, en donde la molécula biológicamente activa es un péptido.
- E72. El método de E65 o 66, en donde la molécula biológicamente activa es un inhibidor de fusión viral.
- E73. El método de E72, en donde el inhibidor de fusión viral es un inhibidor de fusión viral HIV.

- E74. El método de E73, en donde el inhibidor de fusión viral HIV es T20 (SEQ ID NO:1), T21 (SEQ ID NO:2), T1249 (SEQ ID NO:3).
- E75. El método de E65 o 66, en donde la molécula biológicamente activa comprende un factor de coagulación.
- E76. El método de E75, en donde el factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa.
- 5 E77. El método de E75, en donde el factor de coagulación es un Factor IX.
- E78. El método de E65 o 66 en donde la molécula biológicamente activa es una molécula pequeña.
- E79. El método de E65 o 66, en donde la molécula biológicamente activa comprende un ácido nucleico.
- E80. El método de E79, en donde el ácido nucleico es ADN o ARN.
- E81. El método de E79, en donde el ácido nucleico es una molécula antisentido.
- 10 E82. El método de E79, en donde el ácido nucleico es una ribozima.
- E83. El método de E65 o 66, en donde la molécula biológicamente activa comprende un factor de crecimiento u hormona.
- E84. El método de E83, en donde el factor de crecimiento es eritropoyetina.
- E85. El método de E65 o 66, en donde los dímeros se aíslan mediante cromatografía.
- 15 E86. El método de E65 o 66, en donde la célula es una célula eucariota.
- E87. El método de E86, en donde la célula eucariota es una célula CHO.
- E88. El método de E65 o 66, en donde la célula es una célula procariota.
- E89. El método de E88, en donde la célula procariota es *E. coli*.
- 20 E90. Un método de tratar un sujeto con una enfermedad o afección que comprende administrar una proteína quimérica al sujeto, de forma tal que dicha enfermedad o afección se trata, en donde dicha proteína quimérica comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos,
- a) dicha primera cadena que comprende un componente de unión de FcRn, and a molécula biológicamente activa and
- b) dicha segunda cadena que comprende un b) componente de unión de FcRn sin una molécula biológicamente activa
- 25 o una región variable de una inmunoglobulina.
- E91. El método de E90, en donde dicha proteína quimérica se administra por vía intravenosa, subcutánea, oral bucal, sublingual, nasal, parenteral, rectal, vagina, o por ruta pulmonar.
- E92. El método de E90, en donde dicha enfermedad o afección es una infección vírica.
- E93. El método de E90, en donde la molécula biológicamente activa es interferón.
- 30 E94. El método de E93, en donde el interferón es interferón α y tiene un ligante of 15-25 aminoácidos.
- E95. El método de E94, en donde el interferón α tiene un ligante de 15-20 aminoácidos.
- E96. El método de E90, en donde dicha enfermedad o afección es HIV.
- E97. El método de E90, en donde dicha molécula biológicamente activa es un inhibidor de fusión viral.
- E98. El método de E97, en donde dicho inhibidor de fusión viral es T20, T21, o T1249.
- 35 E99. El método de E90, en donde dicha enfermedad o afección es un trastorno hemostático.
- E100. El método de E90, en donde dicha enfermedad o afección es hemofilia A.
- E101. El método de E90, en donde dicha enfermedad o afección es hemofilia B.
- E102. El método de E90, en donde dicha molécula biológicamente activa es Factor VII o Factor VIIa.
- E103. El método de E90, en donde dicha molécula biológicamente activa es Factor IX.
- 40 E104. El método de E90, en donde dicha enfermedad o afección es anemia.

ES 2 582 947 T3

E105. El método de E90, en donde dicha molécula biológicamente activa es eritropoyetina.

E106. Una proteína quimérica de la fórmula



5 en donde X es una molécula biológicamente activa, L es un ligante, F es al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y a es cualquier número entero o cero.

E107. La proteína quimérica de E106, en donde F es un componente de unión de FcRn.

E108. La proteína quimérica de E106, en donde el FcRn es un péptido mimético de un fragmento de Fc de una inmunoglobulina.

E109. La proteína quimérica de E106 o 107, en donde cada F está químicamente asociado con el otro F.

10 E110. El método de E109, en donde la asociación química es una interacción no covalente.

E111. El método de E109, en donde el enlace químico es un enlace covalente.

E112. El método de E109, en donde el enlace químico es un enlace disulfuro.

E113. La proteína quimérica de E106, o 107, en donde F está unido a F mediante un enlace que no es un enlace disulfuro.

15 E114. La proteína quimérica de E106, en donde F es una región constante de inmunoglobulina IgG.

E115. La proteína quimérica de E106, en donde F es una IgG1.

E116. La proteína quimérica de E106, en donde F es un Fragmento de Fc.

E117. La proteína quimérica de E106, en donde X es un polipéptido

E118. La proteína quimérica de E106, en donde X es leuprolida.

20 E119. La proteína quimérica de E106, en donde X es una molécula pequeña.

E120. La proteína quimérica de E119, en donde la molécula pequeña es un antagonista de VLA4.

E121. La proteína quimérica de E106, en donde X es un inhibidor de fusión viral.

E122. La proteína quimérica de E121, en donde el inhibidor de fusión viral es un inhibidor de fusión HIV.

25 E123. La proteína quimérica de E122, en donde el inhibidor de fusión HIV es T20 (SEQ ID NO:1), o T21 (SEQ ID NO:2), o T1249 (SEQ ID NO:3).

E124. La proteína quimérica de E106 o 107, en donde X es un factor de coagulación.

E125. La proteína quimérica de E124, en donde el factor de coagulación es Factor VII o VIIa.

E126. La proteína quimérica de E124, en donde el factor de coagulación es Factor IX.

E127. La proteína quimérica de E106 o 107, en donde X es un ácido nucleico.

30 E128. La proteína quimérica de E127, en donde el ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN.

E129. La proteína quimérica de E106 o 107, en donde X es un factor de crecimiento.

E130. La proteína quimérica de E129, en donde el factor de crecimiento es eritropoyetina.

E131. Un método de tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto que comprende administrar la proteína quimérica de E1, 5, 32, 37, 106, a 107 a dicho sujeto.

35 E132. El método de E131, en donde la enfermedad o afección es una infección vírica.

E133. El método de E131, en donde la molécula biológicamente activa es interferón.

E134. El método de E133, en donde el interferón es interferón α y tiene un ligante of 15-25 aminoácidos.

E135. El método de E134, en donde el interferón α tiene un ligante of 15-20 aminoácidos.

E136. El método de E132, en donde la infección vírica es HIV.

- E137. El método de E131, en donde la enfermedad o afección es un trastorno hemorrágico.
- E138. El método de E137, en donde el trastorno hemorrágico es hemofilia A.
- E139. El método de E137, en donde el trastorno hemorrágico es hemofilia B.
- E140. El método de E131, en donde la enfermedad o afección es anemia.
- 5 E141. El método de E131, en donde la proteína quimérica se administra por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, oral, bucal, sublingual, nasal, rectal, vaginal, por vía de un aerosol, o ruta pulmonar.
- E142. El método de E141, en donde la proteína quimérica se administra vía una ruta pulmonar.
- E143. El método de E141, en donde la proteína quimérica se administra oralmente.
- E144. El método de E131, en donde la inmunoglobulina es igG.
- 10 E145. El método de E131, en donde la parte de una inmunoglobulina es un fragmento de Fc.
- E146. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos unidas entre sí, en donde dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin la molécula biológicamente activa de la primera cadena y en donde dicha segunda cadena no está unida covalentemente a ninguna molécula que tenga un peso molecular mayor que 2 kD.
- 15 E147. La proteína quimérica de E146, en donde la parte de una región constante de inmunoglobulina es un componente de unión de FcRn.
- E148. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos unidas entre sí, en donde dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina unida no covalentemente a cualquier otra molécula excepto la parte de una inmunoglobulina de dicha primera cadena de polipéptidos.
- 20 E149. La proteína quimérica de E148, en donde la parte de una región constante de inmunoglobulina es un componente de unión de FcRn.
- E150. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos unidas entre sí, en donde dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena consiste en al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina.
- 25 E151. La proteína quimérica de E150, en donde la parte de una región constante de inmunoglobulina es un componente de unión de FcRn.
- 30 E152. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos unidas entre sí, en donde dicha primera cadena comprende una molécula biológicamente activa y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin la molécula biológicamente activa de la primera cadena y una molécula con un peso molecular menor de 2 kD unida covalentemente.
- 35 E153. La proteína quimérica de E152, en donde la parte de una región constante de inmunoglobulina es un componente de unión de FcRn.
- E154. Un método de obtención de una proteína quimérica que comprende un fragmento de Fc de una inmunoglobulina unido a una molécula biológicamente activa, comprendiendo dicho método
- 40 a) transfectar una célula con un constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un fragmento de Fc de una inmunoglobulina y una segunda secuencia de ADN que codifica inteína;
- b) cultivar dicha célula en condiciones tales que se expresan el fragmento de Fc y la inteína;
- c) aislar dicho fragmento de Fc e inteína de dicha célula;
- d) sintetizar químicamente una molécula biológicamente activa que tiene un Cys N terminal;
- 45 e) hacer reaccionar la inteína aislada Fc de c) con MESNA para generar un tio-éster C terminal;
- f) hacer reaccionar la molécula biológicamente activa de d) con el Fc de e) para obtener una proteína quimérica que comprende un Fc unido a una molécula biológicamente activa.

E155. Un método de obtención de una proteína quimérica que comprende un fragmento de Fc de una inmunoglobulina unido a una molécula biológicamente activa, comprendiendo dicho método

- 5 a) transfectar una célula con un constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un fragmento de Fc de una inmunoglobulina y una segunda secuencia de ADN que codifica un péptido en donde dicha señal peptídica es adyacente a un fragmento de Fc cisteína.
- b) cultivar dicha célula en condiciones tales que se expresen el fragmento de Fc y la señal peptídica y el fragmento de Fc se secrete de la célula sin la señal peptídica y con una cisteína N terminal;
- c) aislar dímeros de dicho fragmento de Fc con una cisteína N terminal de dicha célula;
- d) sintetizar químicamente una molécula biológicamente activa que tiene un tioéster;
- 10 e) hacer reaccionar la molécula biológicamente activa de d) con el Fc de c) en condiciones tales que la molécula biológicamente activa se pueda unir a una cadena del dímero de c) para obtener una proteína quimérica que comprende un Fc unido a una molécula biológicamente activa.

E156. El método de E155, en donde el tioéster es un tioéster C terminal.

15 E157. Un método de obtención de una proteína quimérica que comprende un fragmento de Fc de una inmunoglobulina unido a una molécula biológicamente activa, comprendiendo dicho método

- a) transfectar una célula con un constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un fragmento de Fc de una inmunoglobulina y una segunda secuencia de ADN que codifica una señal peptídica en donde dicha señal peptídica es adyacente a un fragmento de Fc cisteína;
- 20 b) cultivar dicha célula en condiciones tales que se expresen el fragmento de Fc y la señal peptídica unidos entre sí y dicha señal peptídica se escinda del fragmento de Fc por la célula en una primera posición adyacente a una cisteína o a una segunda posición adyacente a una valina;
- c) aislar dímeros de dicho fragmento de Fc con dos cisteínas N terminales o dos valinas N terminales o una cisteína N terminal y una valina N terminal de dicha célula;
- d) sintetizar químicamente una molécula biológicamente activa que tiene un tioéster;
- 25 e) hacer reaccionar la molécula biológicamente activa de d) con los dímeros de c) para obtener una proteína quimérica que comprende una primera cadena que comprende un Fc unido a una molécula biológicamente activa y una segunda cadena que comprende un Fc que no está unido a ninguna molécula biológicamente activa o una región variable de una inmunoglobulina.

E158. El método de E157, en donde el tioéster es un tioéster C terminal.

30 E159. La proteína quimérica de E20, en donde el ligante es (GGGS)₃.

E160. Un método para aislar un híbrido monómero-dímero de una mezcla, donde la mezcla comprende,

- 35 a) el híbrido monómero-dímero que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en donde la primera cadena comprende una molécula biológicamente activa, y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y en donde la segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin una molécula biológicamente activa o región variable de inmunoglobulina;
- b) un dímero que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en donde la primera y segunda cadenas comprenden una molécula biológicamente activa, y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina;
- c) una parte de una región constante de inmunoglobulina; comprendiendo dicho método
- 40 1) poner en contacto la mezcla con un ligando colorante unido a un soporte sólido en condiciones adecuadas tales que tanto el híbrido monómero-dímero como el dímero se unen al ligando colorante;
- 2) eliminar la parte no unida de una región constante de inmunoglobulina;
- 3) alterar las condiciones adecuadas de 1) de forma tal que la unión entre el híbrido monómero-dímero y el ligando colorante al soporte sólido se altere;
- 45 4) aislar el híbrido monómero-dímero.

E161. El método de E160, en donde la parte de una inmunoglobulina es un Fragmento de Fc

- E162. El método de E160, en donde el ligando colorante es una molécula bio-mimética.
- E163. El método de E160, en donde el ligando colorante se elige de Mimetic Red 1TM, Mimetic Red 2TM, Mimetic Orange 1TM, Mimetic Orange 2TM, Mimetic Orange 3TM, Mimetic Yellow 1TM, Mimetic Yellow 2TM, Mimetic Green 1TM, Mimetic Blue 1TM y Mimetic Blue 2TM.
- 5 E164. El método de E160, en donde la proteína quimérica comprende Epo.
- E165. El método de E163 o 164, en donde el ligando colorante es Mimetic Red 2TM.
- E166. El método de E160, en donde la proteína quimérica comprende Factor VII o VIIa.
- E167. El método de E160, en donde la proteína quimérica comprende Factor IX.
- E168. El método de E160, en donde la proteína quimérica comprende interferón.
- 10 E169. El método de E160, en donde la proteína quimérica comprende un inhibidor de fusión HIV.
- E170. El método de E163, o 167, en donde el ligando colorante es Mimetic Green 1TM.
- E171. El método de E160, en donde las condiciones adecuadas comprenden un tampón que tiene un pH en el intervalo de 4-9 inclusive.
- 15 E172. El método de E171, en donde la alteración de las condiciones adecuadas comprende añadir al menos una sal al tampón a una concentración suficiente para alterar la unión del híbrido monómero-dímero al ligando colorante aislando así el híbrido monómero-dímero.
- E173. El método de E172, en donde la al menos una sal es NaCl.
- E174. El método de E171, en donde el tampón tiene un pH de 8.
- E175. El método de E174, en donde la concentración de sal es 400 mM y la proteína quimérica comprende Epo.
- 20 E176. El método de E172, que además comprende añadir una concentración más elevada de sal en comparación a la concentración de sal que altera la unión del híbrido monómero-dímero al ligando colorante de forma tal que la concentración más elevada de sal altera la unión del dímero al ligando colorante aislando de ese modo el dímero.
- E177. La proteína quimérica de E18, en donde la molécula biológicamente activa es interferón α .
- E178. La proteína quimérica de E18, en donde la molécula biológicamente activa es interferón β .
- 25 E179. La proteína quimérica de E42, en donde la molécula biológicamente activa es interferón α .
- E180. La proteína quimérica de E42, en donde la molécula biológicamente activa es interferón β .
- E181. El método de E68, en donde la molécula biológicamente activa es interferón α .
- E182. El método de E68, en donde la molécula biológicamente activa es interferón β .
- E183. El método de E93, en donde la molécula biológicamente activa es interferón α .
- 30 E184. El método de E93, en donde la molécula biológicamente activa es interferón β .
- E185. El método de E133, en donde la molécula biológicamente activa es interferón α .
- E186. El método de E133, en donde la molécula biológicamente activa es interferón β .
- E187. El método de E168, en donde la proteína quimérica comprende interferón α .
- E188. El método de E168, en donde la proteína quimérica comprende interferón β .
- 35 E189. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en donde dicha primera cadena comprende EPO, un ligante de ocho aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos EFAGAAAV, y un fragmento de Fc de una región constante de inmunoglobulina que comprende una mutación de aspargina a alanina en la posición 297; y
- 40 en donde dicha segunda cadena comprende un fragmento de Fc de una región constante de inmunoglobulina que comprende una mutación de aspargina a alanina en posición 297.
- E190. La proteína quimérica de E189, que además comprende una marca de afinidad.

E191. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en donde dicha primera cadena comprende IFN β , un ligante de ocho aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos EFAGAAAV, y un fragmento de Fc de una región constante de inmunoglobulina que comprende una mutación de aspargina a alanina en la posición 297; y

5 en donde dicha segunda cadena comprende un Fragmento de Fc de una región constante de inmunoglobulina que comprende una mutación de aspargina a alanina en la posición 297.

E192. La proteína quimérica de E191, que además comprende una marca de afinidad.

10 E193. Una proteína quimérica que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, en donde dicha primera cadena comprende factor IX, un ligante de ocho aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos EFAGAAAV, y un fragmento de Fc de una región constante de inmunoglobulina que comprende una mutación de aspargina a alanina en la posición 297; y

en donde dicha segunda cadena comprende un fragmento de Fc de una región constante de inmunoglobulina que comprende una mutación de aspargina a alanina en la posición 297.

E194. La proteína quimérica de E193, que además comprende una marca de afinidad.

15

LISTADO SE SECUENCIAS

<110> SYNTONIX PHARMACEUTICALS, INC.

5 <120> HÍBRIDOS DE MONÓMERO-DÍMERO QUIMÉRICOS DE INMUNOGLOBULINA

<130> 08945.0007-00304

10 <140> PCT/US04/14064
<141> 06-05-2004

<150> 60/539.207
<151> 26-01-2004

15 <150> 60/487.964
<151> 17-07-2003

20 <150> 60/469.600
<151> 06-05-2003

<160> 107

<170> PatentIn Ver. 3.3

25 <210> 1
<211> 36
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humana

30 <400> 1

Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln
1 5 10 15

Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu
20 25 30

Trp Asn Trp Phe
35

35 <210> 2
<211> 37
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humana

40 <400> 2

Asn Asn Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr
1 5 10 15

Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg
20 25 30

Tyr Leu Lys Asp Gln
35

45 <210> 3
<211> 39
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 3

ES 2 582 947 T3

Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln
 1 5 10 15
 Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp
 20 25 30
 Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe
 35

<210> 4
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 714
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 582 947 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 5

```

atgggcattg aaggcagagg cgccgctgcg gtcgatacta gtcacacatg cccaccgtgc 60
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac 120
accctcatga tctcccggac cctgaggtc acatgcgtgg tggtaggacgt gagccacgaa 180
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 240
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 300
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcca 360
gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 420
accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 480
aaaggtctct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 540
aactacaaga ccacgcctcc cgtgttgac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag 600
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaactct tctcatgctc cgtgatgcat 660
5 gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agtctctccc tgtctccggg tttt 714

```

<210> 6

<211> 671

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

15 <400> 6

```

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

```

ES 2 582 947 T3

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
 85 90 95
 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
 100 105 110
 Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
 115 120 125
 Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
 130 135 140
 Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
 145 150 155 160
 Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
 165 170 175
 Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
 180 185 190
 Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
 195 200 205
 Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
 210 215 220
 Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
 225 230 235 240
 Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
 245 250 255
 Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
 260 265 270
 Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
 275 280 285
 Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
 290 295 300
 Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
 305 310 315 320
 Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
 325 330 335
 Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
 340 345 350
 Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
 355 360 365
 Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
 370 375 380
 Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
 385 390 395 400

ES 2 582 947 T3

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
 405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
 420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Asp Lys Thr His
 435 440 445

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 450 455 460

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 465 470 475 480

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 485 490 495

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 500 505 510

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 515 520 525

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 530 535 540

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 545 550 555 560

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 565 570 575

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 580 585 590

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 595 600 605

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 610 615 620

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 625 630 635 640

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 645 650 655

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660 665 670

<210> 7

<211> 2016

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

10

<400> 7

ES 2 582 947 T3

```

atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60
gcagtccttcg taaccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120
gcggtcctgg aggagctgc gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180
tccttcgagg aggcccgga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240
tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctctgcaag 300
gaccagctcc agtctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggtgtga gcagtactgc 420
agtgaccaca cggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480
gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540
aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaagg 600
gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660
atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720
aacctgatcg cgtgctggg cgagcacgac ctacagcagc acgacgggga tgagcagagc 780
cggcggtggt cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840
atcgcgctgc tccgctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gccctctgc 900
ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020
ccccgctga tgaccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080
atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140
gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200
agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260
tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gccaggagt cctcctgcga 1320
gccccatttc ccgacaaaac tcacacgtgc ccgcccgtcc cagctccgga actgctgggc 1380
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 1440
cctgagctca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagtcaac 1500
tggtacgtgg acgcggtgga ggtgcataat gccaaagcaa agccgcgga ggagcagtac 1560
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1620
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1680
tcaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1740
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcag 1800
atcgccgtgg agtgggagag caatgggagc ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1860
gtgttggtgact ccgacggctc cttcttctc tcagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1920
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttcca caaccactac 1980
acgcagaaga gcctctcctt gtctccgggt aatga 2016

```

<210> 8

<211> 696

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 8

```

Met  Gln  Arg  Val  Asn  Met  Ile  Met  Ala  Glu  Ser  Pro  Gly  Leu  Ile  Thr
   1              5              10              15

Ile  Cys  Leu  Leu  Gly  Tyr  Leu  Leu  Ser  Ala  Glu  Cys  Thr  Val  Phe  Leu
                20              25              30

Asp  His  Glu  Asn  Ala  Asn  Lys  Ile  Leu  Asn  Arg  Pro  Lys  Arg  Tyr  Asn
                35              40              45

Ser  Gly  Lys  Leu  Glu  Glu  Phe  Val  Gln  Gly  Asn  Leu  Glu  Arg  Glu  Cys
   50              55              60

```

ES 2 582 947 T3

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
85 90 95

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

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
370 375 380

ES 2 582 947 T3

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
 405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
 420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
 435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Glu Phe Ala
 450 455 460

Gly Ala Ala Ala Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 465 470 475 480

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 485 490 495

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 500 505 510

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 515 520 525

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 530 535 540

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 545 550 555 560

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 565 570 575

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 580 585 590

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 595 600 605

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 610 615 620

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 625 630 635 640

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 645 650 655

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 660 665 670

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 675 680 685

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 690 695

<210> 9
 <211> 2091
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 9

5

10

ES 2 582 947 T3

```

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcacccat ctgcctttta 60
ggatatctac tcagtgtctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120
ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaacctt 180
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt tttgaaaac 240
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300
ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc 360
tttgatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420
tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaaggtgg tttgctcctg tactgagggg 480
tatcgacttg cagaaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540
gtttctgttt cacaaacttc taagtcacc cgtgctgaga ctgttttcc tgatgtggac 600
tatgtaaatt ctactgaagc tgaaacatt ttggataaca tcaactcaaag cacccaatca 660
tttaatgact tcaactcgggt tgttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attcccttgg 720
caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780
tggattgtaa ctgctgcccc ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgtcgcaggt 840
gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900
cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa 960
ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa 1020
tacacgaaca tcttcctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080
caciaaagga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140
acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tgggttccat 1200
gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260
gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tgggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320
tatggaatat ataccaaggt atcccggtat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc 1380
actgaattcg ccggcgccgc tgcggctgcac aaaactcaca catgccacc gtgcccagca 1440
cctgaaactc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 1500
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct 1560
gaggtcgaat tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 1620
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggctcagc tcctcaccgt cctgaccag 1680
gactgctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 1740
atcgagaaaa ccactcctcaa agccaaaggc cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1800
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1860
ttctatcca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1920
aagaccagc ctcccgtgtt ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1980
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggtc 2040
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 2091

```

<210> 10

<211> 423

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 10

```

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
  1             5             10             15

```

ES 2 582 947 T3

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

ES 2 582 947 T3

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 355 360 365

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 370 375 380

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 385 390 395 400

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 405 410 415

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 420

<210> 11

<211> 1272

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 11

```

atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctccctggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc 60
tctgtgggct gtgatctgcc tcaaaccac agcctgggta gcaggaggac ctgatgctc 120
ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc tctctgctga aggacagaca tgactttgga 180
tttccccagg aggagtttgg caaccagttc caaaaggctg aaaccatccc tgtcctccat 240
gagatgatcc agcagatctt caatctcttc agcacaagg actcatctgc tgcttgggat 300
gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc 360
tgtgtgatac agggggtggg ggtgacagag actcccctga tgaaggagga ctccattctg 420
gctgtgagga aatacttcca aagaatcact ctctatctga aagagaagaa atacagccct 480
tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaaatc atgagatctt tttctttgtc aacaaacttg 540
caagaaagtt taagaagtaa ggaagaattc gccggcgccg ctgctggtcg caaaactcac 600
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 660
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtgggtg 720
gacgtgagcc acgaagacc tgagggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 780
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 840
gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 900
aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 960
gaaccaagcagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1020
ctgacctgcc tggtaaaggg ctctctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1080
gggcagccgg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgt tggactccga cggtccttc 1140
ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1200
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1260
ccgggtaaat ga 1272
    
```

15 <210> 12

<211> 415

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 12

ES 2 582 947 T3

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

ES 2 582 947 T3

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 305 310 315 320

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 325 330 335

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 340 345 350

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 355 360 365

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 370 375 380

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 385 390 395 400

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 405 410 415

<210> 13
 <211> 1248
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 13

```

atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctctggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc 60
tctgtgggct gtgatctgcc tcaaaccac agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc 120
ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc tcctgcttga aggacagaca tgactttgga 180
tttccccagg aggagtttgg caaccagttc caaaaggctg aaaccatccc tgtcctccat 240
gagatgatcc agcagatctt caatctcttc agcacaaaagg actcatctgc tgctgggat 300
gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc 360
tgtgtgatac agggggtggg ggtgacagag actcccctga tgaaggagga ctccattctg 420
gctgtgagga aatacttcca aagaatcact ctctatctga aagagaagaa atacagccct 480
tgtgcctggg aggttgctag agcagaaaatc atgagatctt tttctttgtc aacaaacttg 540
caagaagtt taagaagtaa ggaagacaaa actcacacgt gcccgccgtg cccagctccg 600
gaactgctgg gcggaccgtc agtcttcttc tccccccaa aacccaagga caccctcatg 660
atctcccgga ccctgaggt cacatgctgt gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 720
gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgctg 780
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 840
tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 900
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 960
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1020
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1080
accacgcctc ccgtgttggg ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1140
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1200
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1248
    
```

<210> 14
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 14

ES 2 582 947 T3

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

<210> 15
 <211> 771
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 15

ES 2 582 947 T3

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacgactaca aggacgacga tgacaaggac aaaactcaca catgccacc gtgcccagct 120
ccggaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 180
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct 240
gaggtaaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 300
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 360
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct ccagccccc 420
atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 480
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 540
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 600
aagaccacgc ctcccgtgtt ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 660
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 720
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 771

```

<210> 16

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

10

<400> 16

```

Met Val Pro Cys Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Pro
  1                               10                          15

Thr Gln Thr Arg Ala Gly Ser Arg Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp
          20                25                30

Ser Arg Val Leu Gln Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn
          35                40                45

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

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

Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu
          85                90

Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp
          100               105               110

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

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

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

```


ES 2 582 947 T3

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

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

Gly Gly Glu Tyr Gln Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Gln Leu Glu Ala
 195 200 205

Glu Asn Gln Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Gln Leu Glu His Glu Gly
 210 215 220

Gly Gly Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 17

<211> 1335

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

10

<400> 17

ES 2 582 947 T3

```

atggtaccgt gcacgctgct cctgctggtg gcggccgccc tggctccgac tcagaccgac 60
gccggctcta gagccccacc acgctcctc tgtgacagcc gagtcctgca gaggtacctc 120
ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg cagcttgaat 180
gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag gatggaggtc 240
gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggagc tgtcctgagg 300
ggccaggccc tgttgggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct gcatgtggat 360
aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctggg agcccagaag 420
gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat cactgctgac 480
actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttctctc ggggaaagct gaagctgtac 540
acaggggagg cctgcaggac cggtgacagg gaattcgggtg gtgagtacca ggccctggag 600
aaggaggtgg cccagctgga ggccgagaac caggccctgg agaaggaggt ggcccagctg 660
gagcacgagg gtggtggtcc cgcacccgag ctgctgggag gaccgtcagt cttcctcttc 720
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctgaggtcac atgctggtg 780
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 900
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
tccaacaaag cctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1020
cgagaaccac agtgtatcac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1080
agcctgacct gccctggtcaa aggccttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttgactc cgacggctcc 1200
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320
tctccgggta aatga 1335

```

<210> 18

<211> 276

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 18

```

Met Val Pro Cys Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Pro
  1                               10                       15

Thr Gln Thr Arg Ala Gly Glu Phe Gly Gly Glu Tyr Gln Ala Leu Lys
  20                               25                       30

Lys Lys Val Ala Gln Leu Lys Ala Lys Asn Gln Ala Leu Lys Lys Lys
  35                               40                       45

Val Ala Gln Leu Lys His Lys Gly Gly Gly Pro Ala Pro Glu Leu Leu
  50                               55                       60

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
  65                               70                       75                       80

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
  85                               90                       95

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 100                               105                       110

```

ES 2 582 947 T3

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 115 120 125

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 130 135 140

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 145 150 155 160

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 165 170 175

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 195 200 205

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 210 215 220

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 225 230 235 240

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 245 250 255

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 260 265 270

Ser Pro Gly Lys
 275

<210> 19
 <211> 831
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

10 <400> 19

```

atggtaccgt gcaacgtgct cctgctgttg gcgcccgccc tggctccgac tcagaccgcg 60
gccggcgaat tcgggtggtga gtaccaggcc ctgaagaaga aggtggccca gctgaaggcc 120
aagaaccagg ccctgaagaa gaaggtggcc cagctgaagc acaagggcgg cggccccgcc 180
ccagagctcc tgggctggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 240
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 300
gaggtaaagt tcaactggtg cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 360
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 420
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggctcca acaaagccct cccagcccc 480
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 540
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 600
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggagccgga gaacaactac 660
aagaccagc ctcccgtgtt ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagtcacc 720
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 780
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaata a 831
    
```

15 <210> 20
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 20

ES 2 582 947 T3

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

- <210> 21
- 5 <211> 738
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético
- <400> 21

ES 2 582 947 T3

```

atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctctggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc 60
tctgtgggct gcccgccgtg cccagctccg gaactgctgg gcgaccgctc agtcttctc 120
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 180
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 240
gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 300
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 360
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 420
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 480
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 540
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgttga ctccgacggc 600
tccttctcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 660
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa ggcctctcc 720
ctgtctccgg gtaaatga                                     738
    
```

<210> 22

<211> 430

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 22

```

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

ES 2 582 947 T3

130							135									140
Tyr	Phe	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	Pro	
145					150					155					160	
Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg	Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Ser	Phe	Ser	Leu	
			165						170					175		
Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Arg	Ser	Lys	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	
		180						185					190			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
	195						200					205				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
	210					215					220					
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
	225				230					235					240	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
			245						250					255		
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
		260						265					270			
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
		275					280					285				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
	290					295					300					
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
	305				310					315					320	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
				325					330					335		
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
		340						345					350			
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
		355					360					365				
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	
	370					375					380					
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
	385				390					395					400	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
				405					410					415		
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
			420					425					430			

<210> 23
 <211> 1291
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

10

<400> 23

ES 2 582 947 T3

```

atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctctggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc 60
tctgtgggct gtgatctgcc tcaaaccac agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc 120
ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc tctgcttga aggacagaca tgactttgga 180
tttcccagg aggagtttgg caaccagttc caaaaggctg aaaccatccc tgcctccat 240
gagatgatcc agcagatctt caatctcttc agcacaagg actcatctgc tgcttgggat 300
gagacctcc tagacaaatt ctacactgaa ctctaccagc agctgaatga cctggaggcc 360
tgtgtgatac aggggggtgg ggtgacagag actcccctga tgaaggagga ctccattctg 420
gctgtgagga aatacttcca aagaatcact ctctatctga aagagaagaa atacagccct 480
tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaatc atgagatctt tttctttgtc aacaaacttg 540
caagaaagt tacgtagtaa ggaaggtggc ggaggatccg gtggaggcgg gtccggcgg 600
ggagggagcg acaaaactca cacgtgcccg ccgtgccag ctccggaact gctgggcgga 660
ccgtcagttt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg 720
aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt 780
acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 840
gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg 900
agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 960
aagcaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct 1020
gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc 1080
cgtggaagtg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgtt 1140
ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca 1200
gcaggggaac gtcttctcat gtcctgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca 1260
gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaatg a 1291

```

<210> 24
 <211> 428
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

10 <400> 24

```

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

```

ES 2 582 947 T3

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Phe Ala Gly Ala Ala Ala Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 195 200 205

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 210 215 220

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 225 230 235 240

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 245 250 255

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 260 265 270

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 275 280 285

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 290 295 300

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 305 310 315 320

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 325 330 335

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 340 345 350

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 355 360 365

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 370 375 380

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 385 390 395 400

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 405 410 415

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 420 425

- 5 <210> 25
- <211> 1287
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo sintético

<400> 25

```

atgggagtg acgaatgtcc tgcctggctg tggettctcc tgccctgct gtcgctccct 60
ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg 240
atggaggctg ggcagcaggc cgtagaagtc tggcagggcc tggccctgct gtcggaagct 300
gtcctgcggg gccaggccct gttggtcaac tcttcccagc cgtgggagcc cctgcagctg 360
catgtggata aagccgtcag tggccttcgc agcctcacca ctctgcttcg ggctctggga 420
gcccagaagg aagccatctc ccctccagat gcggcctcag ctgctccact ccgaacaatc 480
actgtgaca ctttccgcaa actcttccga gtctactcca atttcctccg gggaaagctg 540
aagctgtaca caggggaggc ctgcagaaca ggggacagag agttcgccgg cgccgctgcg 600
gtcgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagctccgg aactcctggg cggaccgtca 660
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 720
acatgcgtgg tgggtggacg gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 780
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgaggg aggagcagta caacagcacg 840
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 900
aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaagacc 960
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1020
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttct atcccagcga catcgccgtg 1080
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgtggac 1140
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag 1200
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1260
agcctctccc tgtctccggg taaatga . 1287
    
```

5

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 26

15

```

Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro
  1                               5           10
    
```

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

25

<400> 27

```

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
  1                               5
    
```

30

<210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 28

```

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
  1                               5
    
```

40

<210> 29
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 29

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys
 1 5

10 <210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 30

20 Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln
 1 5

<210> 31
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

30 <400> 31

Glu Phe Ala Gly Ala Ala Ala Val
 1 5

35 <210> 32
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

<220>
 <223> Esta secuencia puede abarcar 1-10 repeticiones Gly-Ala

45 <400> 32

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Ala
 20

50 <210> 33
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

<220>

<223> Esta secuencia puede abarcar 1-10 repeticiones Gly-Gly

<400> 33

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

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 20 25 30

5

<210> 34

<211> 80

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

15 <220>

<221> característica misc

<222> (1)..(30)

<223> Esta región puede abarcar 1-10 repeticiones Gly-Gly-Ser

20 <220>

<221> característica misc

<222> (31)..(80)

<223> Esta región puede abarcar 1-10 repeticiones Gly-Gly-Gly-Gly-Ser

25 <400> 34

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

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 50 55 60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 65 70 75 80

30 <210> 35

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

<400> 35

Gly Gly Gly
 1

40

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

<400> 36

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

5 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

<400> 37

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

15 <210> 38
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

<400> 38

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

30 <210> 39
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

<400> 39

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

Gly Ser

40 <210> 40
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

<220>
 <223> Esta secuencia puede abarcar 1-10 repeticiones Gly-Gly-Gly-Gly-Ser

50 <400> 40

ES 2 582 947 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser
 50

5 <210> 41
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 41

gctggctagc caccatgga 19

15 <210> 42
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 42

25 cttgtcatcg tcgtcctgt agtcgtcacc agtggaaact ggaac 45

30 <210> 43
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

35 <400> 43

gactacaagg acgacgatga caaggacaaa actcacacat gccaccgtg cccagctccg 60
 gaactcc 67

40 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 44

50 tagtggatcc tcattacc g 21

55 <210> 45
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 45
 5 gctacctgca ggccaccatg gtctcccagg ccctcagg 38
 <210> 46
 <211> 51
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 15 <400> 46
 cagtccgga gctgggcacg gcgggcacgt gtgagtttg tcgggaaatg g 51
 20 <210> 47
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 47
 30 ttactgcaga aggttatgca gcgcgtgaac atg 33
 <210> 48
 <211> 38
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 40 <400> 48
 tttttcgaat tcagtgagct ttgttttc ctaatcc 38
 <210> 49
 45 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 49
 ggtaagcttg ccatggagct gaggccctgg ttgc 34
 55 <210> 50
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 50
 65 gttttcaatc tctaggacct actcgcc 27

<210> 51
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

 10 <400> 51

 gccaggccac atgactactc cgc 23

 <210> 52
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 52

 ggtgaattct cactcaggca ggtgtgaggg cagc 34
 25
 <210> 53
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 53
 35
 gctactgcag ccaccatggc ctgacctt gctttac 37

 <210> 54
 <211> 35
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 45
 <400> 54

 cgttgaattc ttccttactt cttaaacttt ctgac 35
 50
 <210> 55
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 55

 cagttccgga gctgggcacg gcgggcacgt gtgagttttg tcttccttac ttcttaaact 60
 ttttgcaagt ttg 73
 60

 <210> 56
 <211> 45
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 5 <400> 56
 gtcaggatcc ggcggtggag ggagcgacaa aactcacacg tgccc 45
 10 <210> 57
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 57
 20 tgacgcggcc gctcatttac ccggagacag gg 32
 <210> 58
 <211> 32
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 30 <400> 58
 ccgctagcct gcaggccacc atggccttga cc 32
 <210> 59
 35 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 59
 ccggatccgc cgccacctc ctactacgt aaac 34
 45 <210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético
 <400> 60
 55 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 61
 <211> 60
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 65

ES 2 582 947 T3

<400> 61
 gtcaggatcc ggtggaggcg ggtccggcgg tggagggagc gacaaaactc acacgtgccc 60

5 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 62

15 atagaagcct ttgaccaggc 20

<210> 63
 <211> 84
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 63

gccggcgaat tcggtggtga gtaccaggcc ctgaagaaga aggtggccca gctgaaggcc 60
 aagaaccagg ccctgaagaa gaag 84

<210> 64
 30 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 64

40 gtggcccagc tgaagcaca gggcggcggc cccgcccag agctcctggg cggaccga 58

<210> 65
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 65

50 cggtcggccc aggagctctg gggcggggcc gccgcccttg tgcttcagct gggccacctt 60
 cttcttcagg gcttggttct tg 82

<210> 66
 <211> 60
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

60 <400> 66

gccttcagct gggccacctt cttcttcagg gcttggtact caccaccgaa ttcgccgca 60

ES 2 582 947 T3

<210> 67
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 67
 10
 ccggtgacag ggaattcggg ggtgagtacc aggccctgga gaaggagtg gccagctgg 60
 ag 62
 <210> 68
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 20
 <400> 68
 gccgagaacc aggccctgga gaaggagtg gccagctgg agcacgagg tggtggtccc 60
 gctccagagc tgctgggcgg aca 83
 25
 <210> 69
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 69
 35
 gtccgccag cagctctgga gcgggaccac caccctgtg ctccagctgg gccac 55
 <210> 70
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 45
 <400> 70
 ctcttctcc agggcctggt tctcgccctc cagctgggcc acctcttct ccagggcctg 60
 gtactcacca cgaattccc tgtcaccgga 90
 <210> 71
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 55
 <400> 71
 gctactgcag ccacatggc ctgacctt gctttac 37
 60
 <210> 72
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

5 <400> 72
 cagttccgga gctgggcacg gcggagagcc cacagagcag cttg 44

<210> 73
 10 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 73

20 gtggcatat gggcattgaa ggacagagcgc ccgctgcggt cg 42

<210> 74
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 74

30 ggtggttgc tctccgaaa aaccggaga caggagaga cttctcgcg 50

<210> 75
 <211> 32
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 75

aatctagagc cccaccacgc ctcatctgtg ac 32

45 <210> 76
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 76

55 ttgaattctc tgtcccctgt cctgcaggcc 30

<210> 77
 <211> 27
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65 <400> 77

```

gtacctgcag gcggagatgg gggtgca      27

<210> 78
<211> 22
5 <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
10
<400> 78

cctggtcatc tgcccctgt cc 22

15 <210> 79
   <211> 56
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

20 <220>
   <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

   <400> 79

25 gtccaacctg caggaagctt gccgccacca tgggagtgca cgaatgtct gcctgg      56

   <210> 80
   <211> 67
   <212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial

   <220>
   <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

35 <400> 80

   gccgaattca gttttgtcga ccgcagcggc gccggcgaac tctctgtccc ctgttctgca 60
   ggctcc                                           67

40 <210> 81
   <211> 5
   <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

   <220>
45 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

   <400> 81

   Gly Gly Gly Gly Ser
     1           5

50 <210> 82
   <211> 69
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

55 <220>
   <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

   <400> 82

60 gctgcggtcg acaaaaactca cacatgccca ccgtgccag ctccggaact cctgggcgga 60
   ccgtcagtc                                           69

<210> 83

```

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 83

10 attggaattc tcatttaccg gagacaggg agaggc 36

<210> 84
 <211> 4
 <212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 84

Glu Leu Leu Gly
 1

20 <210> 85
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

<220>
 30 <223> Esta secuencia puede abarcar 1-10 repeticiones Gly

<400> 85

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10

35 <210> 86
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido ligante sintético

<400> 86

45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 87
 <211> 7
 <212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Fragmento de péptido sintético

55 <400> 87

Ser Val Gly Cys Pro Pro Cys
 1 5

60 <210> 88
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Fragmento de péptido sintético

5 <400> 88

Val Gly Cys Pro Pro Cys
1 5

10 <210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Fragmento de péptido sintético

<400> 89

Ser Thr Gly Cys Pro Pro Cys
1 5

20 <210> 90
<211> 4
<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Fragmento de péptido sintético

30 <400> 90

Cys Pro Pro Cys
1

35 <210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido FLAG sintético

<400> 91

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

45 <210> 92
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 92

55 ctagcctgca ggaagcttgc cgccaccatg accaacaagt gtctcctc 48

<210> 93
<211> 51
60 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

5 <400> 93
 ttgtcgacc gcagcggcgc cggcgaactc gttcggagg taacctgtaa g 51

10 <210> 94
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 94

20 ggcaagcttg cgccaccat ggagacagac aactcc 37

<210> 95
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 95

30 tcagtgtga tggatgat gttaccgg agacaggag 40

<210> 96
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

40 <400> 96

ggtaaaccatc atccatca cactgagaa ttcaatc actagtaat tcg 53

45 <210> 97
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 97

55 gctatttagg tgactata gaatactcaa gc 32

<210> 98
 <211> 1269
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 98

ES 2 582 947 T3

atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gcttctccac tacagctctt 60
 tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag 120
 ctctgtggc aattgaatgg gaggcttgaa tattgcctca aggacaggat gaactttgac 180
 atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc 240
 tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg 300
 aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag 360
 acagtctgg aagaaaaact ggagaaagaa gatttcacca ggggaaaact catgagcagt 420
 ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt 480
 cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga 540
 cttacaggtt acctccgaaa cgagttcgcc ggcgccgctg cggtcgacaa aactcacaca 600
 tgcccaccgt gccagctcc ggaactcctg ggcggaccgt cagtcttctt cttccccca 660
 aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 720
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtcc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 780
 aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 840
 ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 900
 aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 960

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg
 1020
 acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1080
 cagccggaga acaactacaa gaccagcct cccgtgttgg actccgacgg ctcttcttc 1140
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1200
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1260
 ggtaaatga 1269

- 5 <210> 99
- <211> 422
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- 10 <400> 99

ES 2 582 947 T3

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20 25 30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50 55 60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95

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

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115 120 125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 130 135 140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Glu Phe Ala Gly Ala
 180 185 190

Ala Ala Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 195 200 205

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 210 215 220

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 225 230 235 240

ES 2 582 947 T3

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 245 250 255

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 260 265 270

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 275 280 285

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 290 295 300

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 325 330 335

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

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 355 360 365

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 370 375 380

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 385 390 395 400

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 405 410 415

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 420

<210> 100
 <211> 102
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 100

tttaagcttg cgcaccat ggagacagac acactcctgc tatgggtact gctgctctgg 60
 gttccagggt ccactggtga caaaactcac acatgccac cg 102

15 <210> 101
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 101

25 ggtcagctca tcgaggatg gg 22

<210> 102
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

ES 2 582 947 T3

<400> 102
cccatccgc gatgagctga cc 22

5 <210> 103
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Kozak sintética
<400> 103

15 gccgccacc 9
<210> 104
<211> 23
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

25 <400> 104
gagcagtacg ctagcacgta ccg 23
<210> 105
30 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 105
ggtacgtgct agcgtactgc tcc 23
40 <210> 106
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
45 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 106
50 ctgacggtcc gcccaggagt tccggagctg ggcaacggtgg gcatgtgtga gttttgtcga 60
ccgcagcgg 69
<210> 107
<211> 6
55 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: 6xHis tag sintética
60 <400> 107

His His His His His His
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína quimérica para uso en un método de tratamiento con una molécula biológicamente activa y dos regiones constantes de inmunoglobulina o partes de las mismas, en donde la proteína quimérica comprende una primera cadena de polipéptidos y una segunda cadena de polipéptidos,
- 5 en donde la primera cadena de polipéptidos comprende la molécula biológicamente activa y una región constante de inmunoglobulina o parte de la misma, que es un componente de unión a receptor neonatal (FcRn), y en donde la molécula biológicamente activa es una proteína seleccionada del grupo que consiste en una citocina, una hormona y un factor de coagulación; y
- 10 en donde la segunda cadena de polipéptidos consiste en una región constante de inmunoglobulina, o una parte de la misma, que es un componente de unión a FcRn y opcionalmente una molécula con un peso molecular no mayor que 2 kD,
2. La proteína quimérica para uso según la reivindicación 1, en donde la primera cadena de polipéptidos además comprende un ligante entre la proteína y la región constante de inmunoglobulina o parte de la misma.
- 15 3. La proteína quimérica para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la parte de la región constante de inmunoglobulina de la primera cadena de polipéptidos es un fragmento de Fc y la parte de la región constante de inmunoglobulina de la segunda cadena de polipéptidos es un fragmento de Fc.
4. La proteína quimérica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la región constante de inmunoglobulina es una región constante de IgG1 o IgG2.
- 20 5. La proteína quimérica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína en la primera cadena de polipéptidos es un factor de coagulación.
6. La proteína quimérica para uso según la reivindicación 5, en donde el factor de coagulación se selecciona del grupo que consiste en Factor VII, Factor VIIa, Factor VIII, Factor V, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, fibrinógeno, protrombina y factor de von Willebrand.
7. La proteína quimérica para uso según la reivindicación 6, en donde el factor de coagulación es Factor IX.
- 25 8. La proteína quimérica para uso según la reivindicación 6, en donde el factor de coagulación es Factor VIII.
9. La proteína quimérica para uso según la reivindicación 6, en donde el factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa.
10. La proteína quimérica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, para uso en el tratamiento de un sujeto que padece un trastorno hemostático.
- 30 11. La proteína quimérica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína en la primera cadena de polipéptidos es una hormona.
12. La proteína quimérica para uso según la reivindicación 11, en donde la hormona es eritropoyetina (EPO).
13. La proteína quimérica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína en la primera cadena de polipéptidos es una citocina.
- 35 14. La proteína quimérica para uso según la reivindicación 13, en donde la citocina es interferón α o interferón β .
15. La proteína quimérica para uso según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, para uso en el tratamiento de una infección vírica.
16. La proteína quimérica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la proteína quimérica va a administrarse intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, por vía oral, bucalmente, sublingualmente, nasalmente, parenteralmente, rectalmente, vaginalmente, por vía de una superficie de la mucosa, mediante un aerosol o por una vía pulmonar.
- 40 17. Una composición farmacéutica, para uso en un método de tratamiento, en donde la composición farmacéutica comprende la proteína quimérica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 18. Un primer polinucleótido que codifica la primera cadena de polipéptidos de la proteína quimérica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, y un segundo polinucleótido que codifica la segunda cadena de polipéptidos de dicha proteína quimérica.
19. Un método de obtención de una proteína quimérica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16,

en donde el método comprende:

transfectar una célula huésped con un primer polinucleótido que codifica la primera cadena de polipéptidos y un segundo polinucleótido que codifica la segunda cadena de polipéptidos;

- 5 cultivar la célula en condiciones tales que se expresan la primera y segunda cadenas de polipéptidos; y aislar la proteína quimérica de dicha célula huésped.

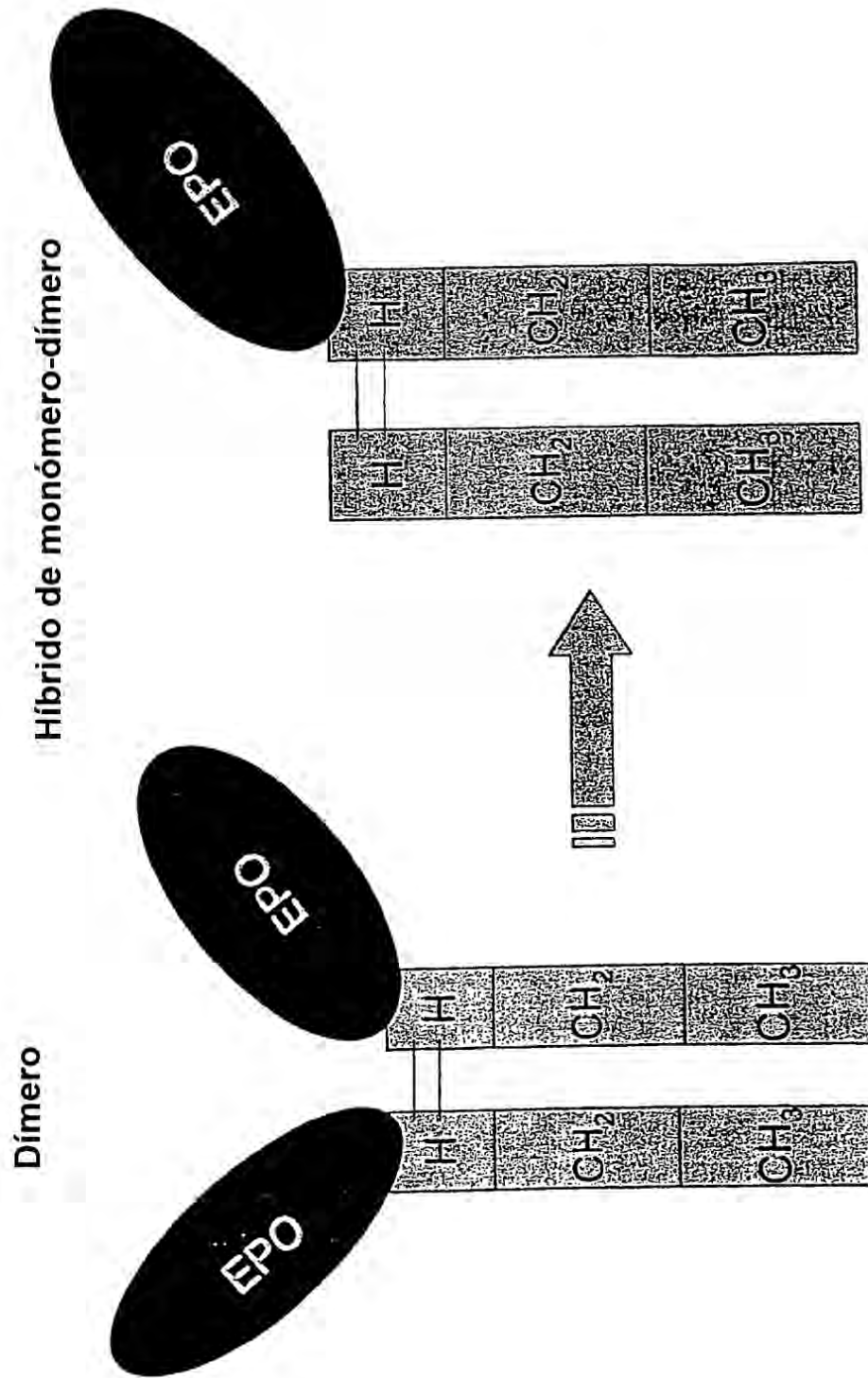


Fig. 1

Fig. 2A

Secuencia de aminoácidos de factor VII-Fc (péptido señal subrayado, propéptido en negrita)

```

  1  MVSQALRLLC  LLGLQGCLA  AVFVTQEEAH  GVLHRRRRAN  AFLEELRPGS
 51  LERECKEEQC  SFEEAREIFK  DAERTKLFWI  SYSDGDQCAS  SPCQNGGSCK
101  DQLQSYICFC  LPAFEGRNCE  THKDDQLICV  NENGGCEQYC  SDHTGTRKSC
151  RCHEGYSLLA  DGVSCTPTVE  YPCGKIPILE  KRNASKPQGR  IVGGKVCPKG
201  ECPWQVLLLV  NGAQLCGGTL  INTIWVVSAA  HCFDKIKNWR  NLI AVLGEHD
251  LSEHDGDEQS  RRVAQVIIPS  TYVPGTTNHD  IALLRLHQPV  VLT DHVPLC
301  LPERTFSERT  LAFVRFSLVS  GWGQLDRGA  TALELMVLNV  PRLMTQDCLQ
351  QSRKVGDSPN  ITEYMFCAGY  SDGSKDSCKG  DSGGPHATHY  RGTWYLTGIV
401  SWGQGCATVG  HFGVYTRVSQ  YIEWLQKLMR  SEPRPGVLLR  APFPDKTHTC
451  PPCPAPELLG  GPSVFLFPPK  PKDTLMISRT  PEVTCVVVDV  SHEDPEVKFN
501  WYVDGVEVHN  AKTKPREBQY  NSTYRVVSVL  TVLHQDWLNG  KEYKCKVSNK
551  ALPAPIEKTI  SKAKGQPREP  QVYTLPPSRD  ELTKNQVSLT  CLVKGFPYPSD
601  IAVEWESNGQ  PENNYKTTPP  VLDSGGSFFL  YSKLTVDKSR  WQQGNVFSCS
651  VMHEALHNHY  TQKSLSLSPG  K

```

Fig. 2B

Secuencia de aminoácidos de factor IX-Fc (péptido señal subrayado, propéptido en negrita)

```

  1  MQRVNMIMAE  SPGLITICLL  GYLLESAECTV  FLDHENANKI  LNRPKRYNSG
 51  KLEEFVQGNL  ERECMEEKCS  FEEAREVFEN  TERTTEFWKQ  YVDGDQCESN
101  PCLNGGSCKD  DINSYECWCP  FGFEGKNCLE  DVTCNIKNGR  CEQFCKNSAD
151  NKVVCSCTEG  YRLAENQKSC  EPAVPFPCGR  VSVSQTSLT  RAETVFPDVD
201  YVNSTEAE TI  LDNITQSTQS  FNDFTRVVGG  EDAKPGQFPW  QVVLNGKVDA
251  FCGGSIVNEK  WIVTAHCVE  TGVKITVVAG  EHNIEETEHT  EQKRN VIRI I
301  PHHNYNAAIN  KYNHDIALLE  LDEPLVLSY  VTPICIADKE  YTNIFLKFGS
351  GYVSGWGRVF  HKGRSALVLQ  YLRVPLVDRA  TCLRSTKFTI  YNNMFCAGFH
401  EGGRDSCQGD  SGGPHVTEVE  GTSFLTGIIS  WGEECAMKGK  YGIYTKVSRY
451  VNWIKEKTKL  TEFAGAAVD  KTHTCPPCPA  PELLGGPSVF  LFPPKPKDTL
501  MISRTPEVTC  VVDVSHEDP  EVKFNWYVDG  VEVHNAKTKP  REEQYNSTYR
551  VSVLTVLHQ  DWLNGKEYKC  KVSNAKALPAP  IEKTISKAKG  QPREPQVYTL
601  PPSRDELTKN  QVELTCLVKG  FYPSDIAVEW  ESNQOPENNY  KTRPPVLDS
651  GSFFLYSKLT  VDKSRWQQGN  VFSCSVMHEA  LHNHYTQKSL  SLSPGK

```

Fig. 2C

Secuencia de aminoácidos de IFN α -Fc (ligante de 8 aminoácidos) (secuencia señal subrayada)

```

  1  MALTFALLVA LLVLSCKSSC  SVGCDLPQTH  SLGSRRTLML  LAQMRRISLF
 51  SCLKDRHDFG  FPQEEFGNQF  QKAETIPVLH  EMIQQIFNLF  STKDSSAAWD
101  ETLLEDKFYTE LYQQLNDLEA  CVIQGVGVTE  TPLMKEDSIL  AVRKYFQRIT
151  LYLKEKKYSP  CAWEVVRAEI  MRSFSLSTNL  QESLRSKEEF  AGAAAVDKTH
201  TCPPCPAPEL  LGGPSVFLFP  PKPKDTLMIS  RTPEVTCVVV  DVSHEDPEVK
251  FNWYVDGVEV  HNAKTKPREE  QYNSTYRVVS  VLTVLHQDWL  NGKEYKCKVS
301  NKALPAPIEK  TISKAKGQPR  EPQVYTLPPS  RDELTKNQVS  LTCLVKGFYP
351  SDIAVEWESN  GQPENNYKTT  PPVLDSDGSF  FLYSKLTVDK  SRWQQGNVFS
401  CSVMHEALHN  HYTQKSLSLS  PGK

```

Fig. 2D

Secuencia de aminoácidos del ligante Δ de IFN α -Fc (secuencia señal subrayada)

```

  1  MALTFALLVA LLVLSCKSSC  SVGCDLPQTH  SLGSRRTLML  LAQMRRISLF
 51  SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF  QKAETIPVLH  EMIQQIFNLF  STKDSSAAWD
101  ETLLEDKFYTE LYQQLNDLEA  CVIQGVGVTE  TPLMKEDSIL  AVRKYFQRIT
151  LYLKEKKYSP  CAWEVVRAEI  MRSFSLSTNL  QESLRSKEDK  THTCPPCPAP
201  ELLGGPSVFL  FPPKPKDTLM  ISRTPEVTCV  VVDVSHEDPE  VKFNWYVDGV
251  EVHNAKTKPR  EEQYNSTYRV  VSVLTVLHQD  WLNGKEYKCK  VSNKALPAPI
301  EKTISKAKGQ  PREPQVYTL  PSRDELTKNQ  VSLTCLVKGF  YPSDIAVEWE
351  SNGQPENNYK  TTPPVLDSDG  SFFLYSKLTV  DKSRWQQGNV  FSCSVMHEAL
401  HNHYTQKSLS  LSPGK

```

Fig. 2E

Secuencia de aminoácidos de Flag-Fc (secuencia señal subrayada)

```

  1  METDTLLLWV LLLWVPGSTG  DDYKDDDDKD  KTHTCPPCPA  PELLGGPSVF
 51  LFPPKPKDTL MISRTPEVTC  VVDVSHEDP  EVKFNWYVDG  VEVHNAKTKP
101  REEQYNSTYR  VSVLTVLHQ  DWLNGKEYKC  KVSNAKALPAP  IEKTISKAKG
151  QPREPQVYTL  PPSRDELTKN  QVSLTCLVKG  FYPSDIAVEW  ESNQGPENNY
201  KTTTPVLDSD  GSFFLYSKLT  VDKSRWQQGN  VFSCSVMHEA  LHNHYTQKSL
251  SLSPGK

```


Fig. 2F

Secuencia de aminoácidos de Epo-CCA-Fc (secuencia señal de K^b subrayada, bobina en espiral ácida en negrita)

1	<u>MVPCTLLLLL</u>	<u>AAALAPTQTR</u>	AGSRAPPRLI	CDSRVLQRYL	LEAKEAENIT
51	TGCAEHCSLN	ENITVPDTKV	NFYAWKRMEV	GQOAVEVWQG	LALLSEAVLR
101	GQALLVNSSQ	PWEPLQLHVD	KAVSGLRSLT	TLLRALGAQK	EAI SPPDAAS
151	AAPLRTITAD	TFRKLFVYS	NFLRGKLY	TGEACRTGDR	EFGGEYQALE
201	KEVAQLEAEN	QALEKEVAQL	EHEGGPPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI
251	SRTPEVTCV	VDVSHEDPE	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRV
301	SVLTVLHQD	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP
351	SRDELTKNQ	SLTCLVKGfy	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS
401	FFLYSKLTV	KSRWQGNV	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK

Fig. 2G

Secuencia de aminoácidos de CCB-Fc (secuencia señal de K^b subrayada, bobina en espiral básica en negrita)

1	<u>MVPCTLLLLL</u>	<u>AAALAPTQTR</u>	<u>AGEFGGEYQA</u>	LKKKVAQLKA	KNQALKKKVA
51	QLKHKGGGPA	PELLGGPSVF	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVDVSHEDP
101	EVKFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQYNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNKEYKC
151	KVSNKALPAP	IEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSRDELTKN	QVSLTCLVKG
201	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTPPVLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQGN
251	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK		

Fig. 2H

Secuencia de aminoácidos de Cys-Fc (secuencia señal de hFN α subrayada)

1	<u>MALTFALLVA</u>	<u>LLVLSCKSSC</u>	<u>SVGCPPCPAP</u>	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM
51	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV
101	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTL
151	PSRDELTKNQ	VSLTCLVKGf	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TPPVLDSDG
201	SFFLYSKLTV	DKSRWQGNV	FSCSVMHEAL	HNHYTQKSL	LSPGK

Fig. 2I

Secuencia de proteínas de IFN α -GS15-Fc (secuencia señal subrayada)

1	<u>MALTFALLVA</u>	<u>LLVLSCKSSC</u>	<u>SVGCDLPQTH</u>	SLGSRRTLML	LAQMRRISLF
51	SCLKDRHDFG	FPQEEFGNQF	QKAETIPVLH	EMIQQIFNLF	STKDSSAAWD
101	ETLLDKFYTE	LYQQLNDLEA	CVIQGVGVTE	TPLMKEDSIL	AVRKYFQRIT
151	LYLKEKKYSP	CAWEVVRAEI	MRSFSLSTNL	QESLRSKEGG	GGSGGGGSGG
201	GGSDKTHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS
251	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK
301	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	LTKNQVSLTC
351	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
401	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK		

Fig. 2J

Secuencia de aminoácidos de Epo-Fc (secuencia señal subrayada, ligante en negrita)

1	<u>MGVHECPAWL</u>	<u>WLLLSLLSLP</u>	<u>LGLPVLGAPP</u>	RLICDSRVLE	RYLLEAKEAE
51	NITTGCAEHC	SLNENITVPD	TKVNFYAWKR	MEVGQQAVEV	WQGLALLSEA
101	VLRGQALLVN	SSQPWEPLQL	HVDKAVSGLR	SLTTLLRALG	AQKEAISPDP
151	AASAAPLRTI	TADTFRKLFR	VYSNFLRGKL	KLYTGEACRT	GDREFAGAAA
201	VDKHTCPCPC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPPEV	TCVVVDVSHS
251	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY
301	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPOVY	TLPPSRDELDT	KNQVSLTCLV
351	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTPPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ
401	GNVFSCSV	MHEALHNHYTQK	SLSLSPGK		

Fig. 3A

Secuencia de nucleótidos de factor VII-Fc (péptido señal subrayado, propéptido en negrita)

atggtctcccagggcctcaggetcctctgecttctgcttgggcttcagggctgectggctgcag
tcttcgtaaaccaggaggaagcccacggcgtcctgcaaccggcgccggcgcccaacgcgttctt
ggaggagctgcgccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggag
gcccgggagatcttcaaggacgaggagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgatgggg
accagtgctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatat
ctgcttctgctccctgcttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatc
tgtgtgaacgagaacggcggctgtgagcagtagctgacgtgaccacacgggaccaagcgtcct
gtcggtgccacgaggggtagctctctgctggcagacgggggtgtcctgcacacccacagttgaata
tccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtg
gggggcaaggtgtgccccaaaggggagtgatccatggcaggtcctgttgtggggaatggagctc
agttgtgtggggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctccgcccactgttccgacaa
aatcaagaactggaggaaactgatcgcgggtgctgggcgagcacgacctcagcgagcacgacggg
gatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatcccagcacgtagctcccggcaccacca
accacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgaccatgtggtgcccct
ctgctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtgcgcttctcattggtcagc
ggctggggccagctgctggaccgtggcgcacggccctggagctcatggtcctcaacgtgcccc
ggctgatgaccaggactgctgcagcagtcacggaaggtgggagactccccaaatatcacgga
gtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgagggc
ccacatgccaccactaccggggcacgtggtacctgacgggcatcgtcagctggggccagggt
gcccacacgtgggccaactttgggggtgtacaccagggtctcccagtagatcgagtggtgcaaaa
gctcatgcgctcagagccacgcccaggagtcctcctgagagcccatttcccgacaaaactcac
acgtgcccgcgctgcccagctccggaactgctgggcggaaccgtcagctcttctcttcccccaa
aacccaaggacaacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag
ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgataatgccaag
aaaagccgcccggaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcctgc
accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccagcccc
catcgagaaaaacctctccaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccc
ccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatc
ccagcgacatcgcgctggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgccc
tcccgtgtggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcagg
tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgc
agaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

Fig. 3B

Secuencia de nucleótidos de factor IX-Fc (péptido señal subrayado, propéptido en negrita)

atgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggat
atctactcagtgctgaatgtacagtttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcg
gccaagaggtataattcaggtaaattggaagagtttgttcaagggaaacctgagagagaatgt
atggaagaaaagtgtagtttgaagaagcagagaagttttgaaaacactgaaagaacaactg
aattttggaagcagtatggtgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaattggcggcag
ttgcaaggatgacattaattcctatgaatggtgggtgtccctttggatttgaaggaaagaactgt
gaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgagagcagttttgtaaaaatagtgctg
ataacaaggtggtttgctcctgtactgagggatatcgacttgcagaaaaccagaagtctgtga
accagcagtgccatttccatgtggaagagttctgtttcacaaaacttctaagctcaccctgtgct
gagactgttttctctgatgtggactatgtaaatctactgaagctgaaaccattttggataaca
tcactcaaagcacccaatcatttaatgacttcactcgggttgttgggtggagaagatgccaacc
aggtcaatcccttggcaggtgttttgaatggtaaagttgatgcattctgtggaggctctatc
gttaatgaaaaatggattgtaactgctgccactgtgttgaaactgggtgttaaaattacagttg
tcgcaggtgaacataatattgaggagacagaacatcacagacaaaagcgaaatgtgattcgaat
tattcctcaccacaactacaatgcagctattaataagtaacaacctgacattgccttctggaa
ctggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgctgacaaggaataca
cgaacatcttctcaaatttggatctggctatgtaagtggctggggaagagctctccacaaagg
gagatcagcttagttcttcagtaccttagagttccacttgttgaccgagccacatgtcttcga
tctacaaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagatt
catgtcaaggagatagtgggggaccccatgttactgaagtggaaagggaccagtttcttaactgg
aattattagctgggggtgaagagtggtgcaatgaaaggcaaatatggaatataaccaaggtatcc
cggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaagctcactgaattcgccggcgccgctgcggtcg
acaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcaccctgaactcctggggggaccgctcagctctcct
cttcccccaaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctgggtg
gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc
ataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct
caccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagcc
ctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaaggtgt
acaacctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaa
aggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactac
aagaccacgcctcccgtgttgactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtgg
acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaa
ccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

Fig. 3C

Secuencia de nucleótidos de IFN α -Fc (ligante de 8 aminoácidos)

```

atggccttgaccttggcttactgggtggccctcctggtgctcagctgcaagtcaagctgctctg
tgggctgtgatctgcctcaaaccacagcctgggtagcaggaggacctgatgctcctggcaca
gatgaggagaatctctcttttctcctgcttgaaggacagacatgactttggatttccccaggag
gagtttggcaaccagttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga
tcttcaatctcttcagcacaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctcctagacaaatt
ctacaactgaactctaccagcagctgaatgaacctggaagcctgtgtgatacagggggtgggggtg
acagagactccctgatgaaggaggactccattctggctgtgaggaaatacttccaaagaatca
ctctctatctgaaagagaagaaatacagcccttgtgcctgggaggttgtcagagcagaaatcat
gagatcttttctttgtcaacaaacttgcaagaaagttaagaagtaaggaagaattcgccggc
gccgctgcggtcgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggac
cgtcagtcttctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggt
cacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtg
tggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggt
ctccaaCaagccctcccagcccccatcgagsaaaccatctccaaagccaaagggcagccccga
gaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctga
cctgectggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcc
ggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgtggactccgacggctccttcttctctacagc
aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatg
aggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga
    
```

Fig. 3D

Secuencia de nucleótidos del ligante Δ de IFNα-Fc

```

atggccttgaccttggcttactggtggccctcctggtgctcagctgcaagtcaagctgctctg
tgggctgtgatctgctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcaca
gatgaggagaatctctctttctcctgcttgaaggacagacatgactttggatttccccaggag
gagtttggcaaccagttccaaaaggetgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga
tcttcaatctcttcagcacaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctcctagacaaatt
ctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaagcctgtgtgatacagggggtgggggtg
acagagactcccctgatgaaggaggactccattctggctgtgaggaaatacttccaaagaatca
ctctctatctgaaagagaagaaatacagcccttgtgacctgggagggttgtcagagcagaaatcat
gagatcttttctttgtcaacaaacttgcaagaaagtttaagaagtaagggaagacaaaactcac
acgtgcccggcgtgcccagctccggaactgctgggaggaccgtcagctctcctcttcccccaa
aacccaaggacaccctcatgatctccggaccctgagggtcacatgcgtggtggtggacgtgag
ccacgaagaccctgaggteagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaag
acaaagccgaggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgc
accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggcttccaacaaagccctcccagccc
catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc
ccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctatc
ccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcc
tcccgtgttggactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg
tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaagc
egaagagcctctcctgctctccgggtaaatga
    
```

Fig. 3E

Secuencia de nucleótidos de Flag-Fc

```

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacg
actacaaggacgacgatgacaaggacaaaactcacacatgccaccgtgccagctccggaact
cctggggggaccgtcagctcttctcttcccccaaaaacccaaggacaccctcatgatctccgg
accctgagggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaact
ggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtaaacag
cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtac
aagtgcaaggcttccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaag
ggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaacca
ggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc
aatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgacggctccttct
tctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctc
cgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaagcagaagagcctctcctgctctccgggtaaa
tga
    
```

Fig. 3F

Secuencia de nucleótidos de Epo-CCA-Fc (secuencia señal de K^b subrayada, bobina en espiral ácida en negrita)

```

atggtaccgtgcaegctgctcctgctgttggcggeccgacctggctccgactcagacccgcgccc
gctctagagccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctgcagaggtacctcttggaggc
caaggaggccgagaatatacagacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcact
gtcccagacaccaaagttaatttctatgcctggaagaggatggaggtcgggcagcaggccgtag
aagtctggcagggcctggccctgctgtcggaagctgtcctgcggggccaggccctgttggca
ctcttcccagccgtgggagccctgcagctgcatgtggataaaagccgtcagtgcccttcgcagc
ctcaccactctgcttcgggctctgggagcccagaaggaagccatctcccctccagatgcggcct
cagctgctccactccgaacaatcactgctgacactttccgcaaactcttccgagctctactccaa
tttcctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggaccggtgacaggggaattc
ggtaggtgagtaccaggccctggagaaggagggtggcccagctggaggccgagaaccaggccctgg
agaaggagggtggcccagctggagcacaggggtggtaggtcccgcacccgagctgctgggaggacc
gtcagctcttctcttcccccaaaaacccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtc
acatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacg
gcgtggaggtgcataaatgccaagacaaagccgcccggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgt
ggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtc
tccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacccatctccaagccaaagggcagccccgag
aaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgac
ctgcttgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggagccg
gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgacggctccttcttctctacagca
agctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatga
ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga
    
```

Fig. 3G

Secuencia de nucleótidos de CCB-Fc (secuencia señal subrayada, bobina en espiral básica en negrita)

```

atggtaccgtgcaegctgctcctgctgttggcggeccgacctggctccgactcagacccgcgccc
gcaaatcggtggtgagtaccaggccctgaagaagaagggtggcccagctgaaggccaagaacca
ggccctgaagaagaagggtggcccagctgaagcacaagggcggcggcccccagagctcctg
ggcggaccgtcagctcttctcttcccccaaaaacccaaggacaccctcatgatctccggacc
ctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtac
cgtggacggcgtggaggtgcataaatgccaagacaaagccgcccggaggagcagtaacaacagcacg
taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
gcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccacgagaaaacccatctccaagccaaagggca
gccccgagaaccaacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtc
agcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
ggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgacggctccttcttct
ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg
atgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga
    
```

Fig. 3H

Secuencia de nucleótidos de Cys-Fc (secuencia señal de hIFN α subrayada)

```

atggccttgaccttgctttactgggtggccctcctgggtgctcagctgcaagtcaagctgctctg
tgggctgcccgcctgcccagctccggaactgctgggcggaccgtcagctctcctcttcccc
aaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtg
agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcca
agacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcct
gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgc
ccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggctcaaaggcttcta
tcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg
cctcccgtgttggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacctggacaagagca
gggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacac
gcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga
    
```

Fig. 3I

Secuencia de nucleótidos de IFN α -GS15-Fc (secuencia señal subrayada)

```

atggccttgaccttgctttactgggtggccctcctgggtgctcagctgcaagtcaagctgctctg
tgggctgtgatctgcctcaaaceccacagcctgggtagcaggaggacctgatgctcctggcaca
gatgaggagaatctctctttctcctgcttgaaggacagacatgacttggatttcccaggag
gagtttggcaaccagttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga
tcttcaatctcttcagcacaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctcctagacaaatt
ctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaggcctgtgtgatcacagggggtgggggtg
acagagactcccctgatgaaggaggactccattctggctgtgaggaaatacttccaaagaatca
ctctctatctgaaagagaagaaatacagcccttgtgcctgggaggttgtcagagcagaaatcat
gagatctttttcttgtcaacaaacttgcaagaaagttaacgtagtaaggaagggtggcggcggga
tccgggtggaggcgggtccggcgggtggagggagcgacaaaactcacacgtgcccggcgtgcccag
ctccggaactgctgggcggaccgtcagtetctcttcccccaaaaacccaaggacaccctcat
gatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccaacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagc
agtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcctgcaccaggactggctgaatgg
caaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc
aaagecaaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctga
ccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggctcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgga
gtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgac
ggctccttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtct
tctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtc
tccgggtaaatga
    
```


Fig. 3J

Secuencia de nucleótidos de Epo-Fc (secuencia señal subrayada, ligante en negrita)

atgggagtgacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctctgg
gcctcccagtcctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacct
cttggaggccaaggaggccgagaatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgag
aatatcaactgtcccagacaccaaagttaatttctatgcctggaagaggatggaggtcgggcagc
aggccgtagaagtctggcagggcctggccctgctgtcggaagctgtcctgcggggccaggccct
gttggtaactcttcccagccgtgggagcccctgcagctgcatgtggataaagccgtcagtgcc
cttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagcccagaaggaagccatctcccctccag
atgcggcctcagctgctccactccgaacaatcaactgctgacacttccgcaaactcttcgagt
ctactccaatttccctccggggaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcagaacaggggac
agagagttcgccggcgccgctgcggctgcacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagctccgg
aactcctgggcggaccgtcagctcttccctcttcccccaaaaacccaaggacaccctcatgatctc
ccggaccctgaggtcacatgctgggtggaggctgagccacgaagaccctgaggtcaagttc
aactggtacgtggacggcgtggaggtgcatatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagta
acagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctgctgcaccaggactggctgaatggcaagga
gtacaagtgcagggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagcc
aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaaga
accaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgga
gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgacggctcc
ttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcat
gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccggg
taaatga

Figura 5a

Secuencia de aminoácidos de Fc-MESNA (producidas en el vector pTWIN1 a partir de NEB; cuando Fc-inteína-CBD se eluye de perlas de quitina con MESNA produce la siguiente proteína con un tioéster del extremo C en el residuo de Phe final)

```

1  MGIEGRGAAA VDTSHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV
51  TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL
101 HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT
151 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK
201 LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGF
    
```

Figura 5b

Secuencia de nucleótidos de Fc-CDS en pTWIN1 (el residuo de F final, ttt, sobresale directamente contiguo a CDS de inteína de Mxe GyrA en pTWIN1)

```

atgggcattgaaggcagaggcgccgctgcggtcgatactagtcacacatgccaccgtgccag
cacctgaaectcctggggggaccgtcagctcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcat
gatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagc
agtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatgg
caaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctga
ccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggtctctatcccagcgacatcgccgtgga
gtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgac
ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaacgtct
tctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagtctctccctgtc
tccgggtttt
    
```

Fig. 6

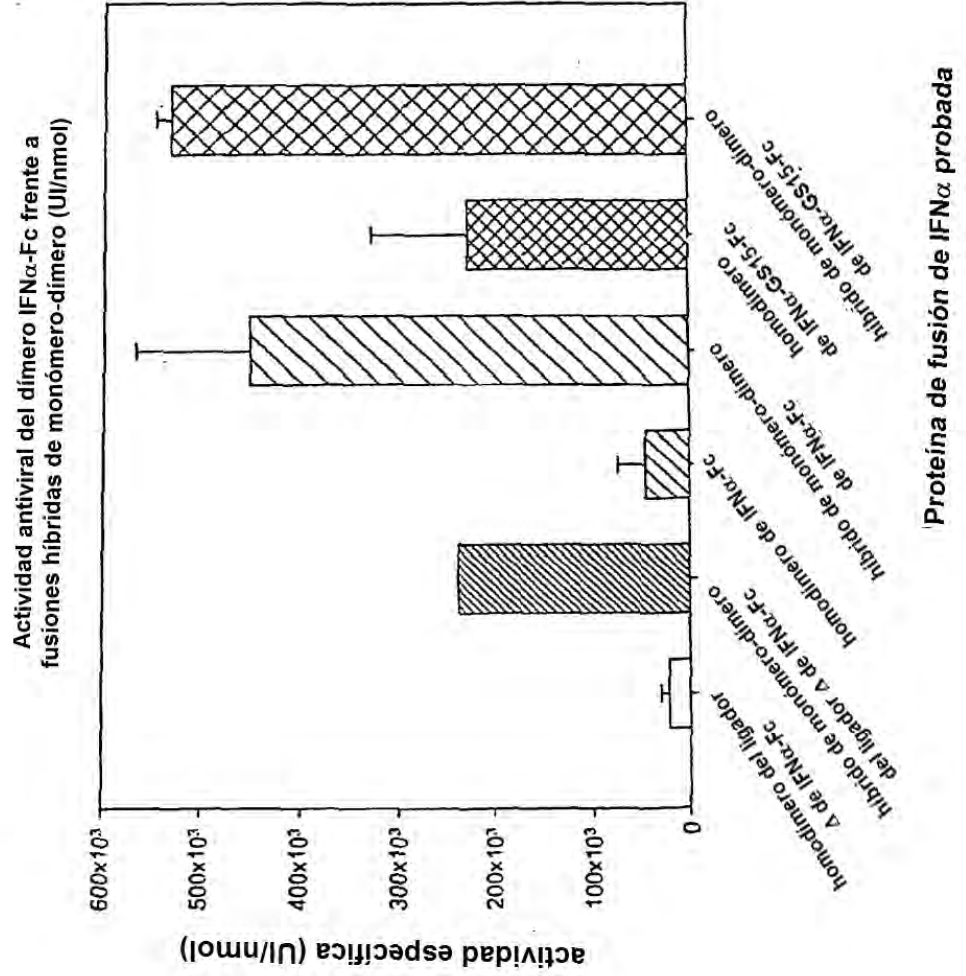


Fig. 7

Ensayo de coagulación de Vila-rTF STA-CLOT

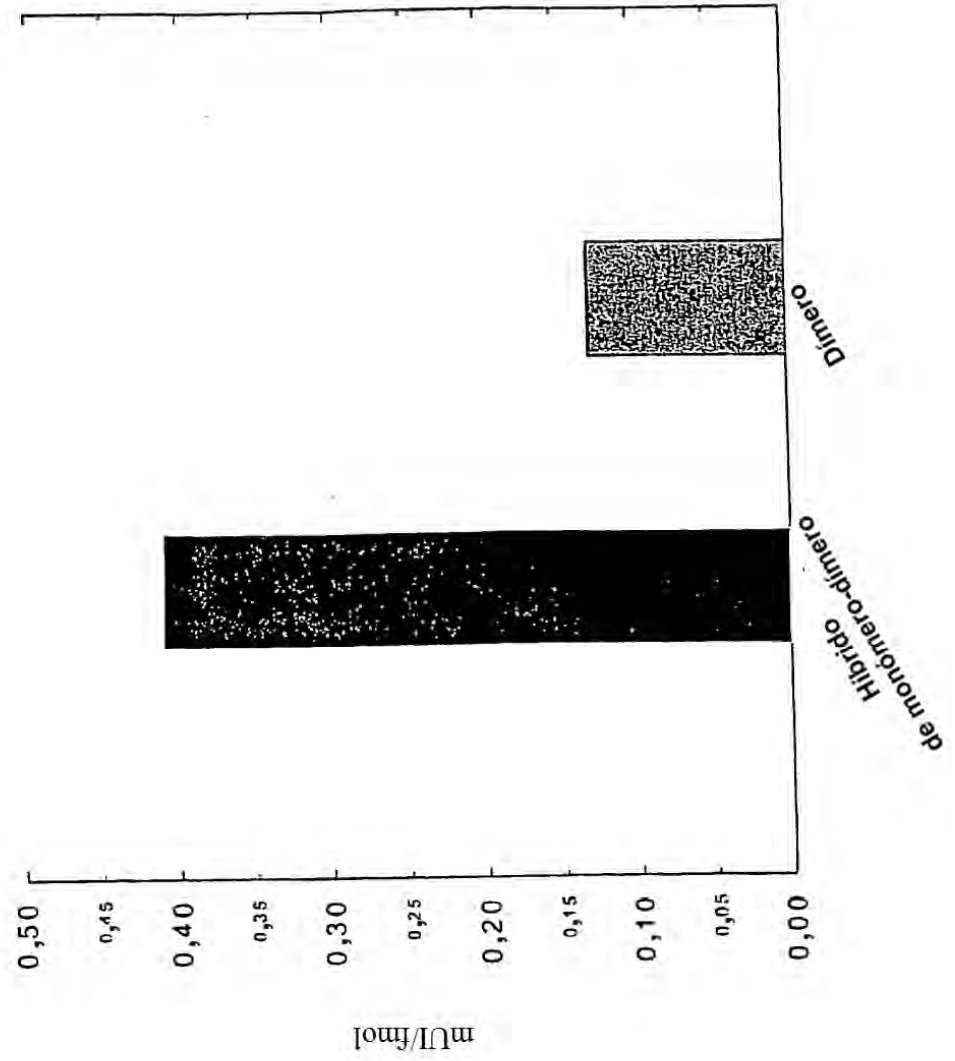


Fig. 8

ELISA de FVII:Ag
Captación oral en ratas neonatas

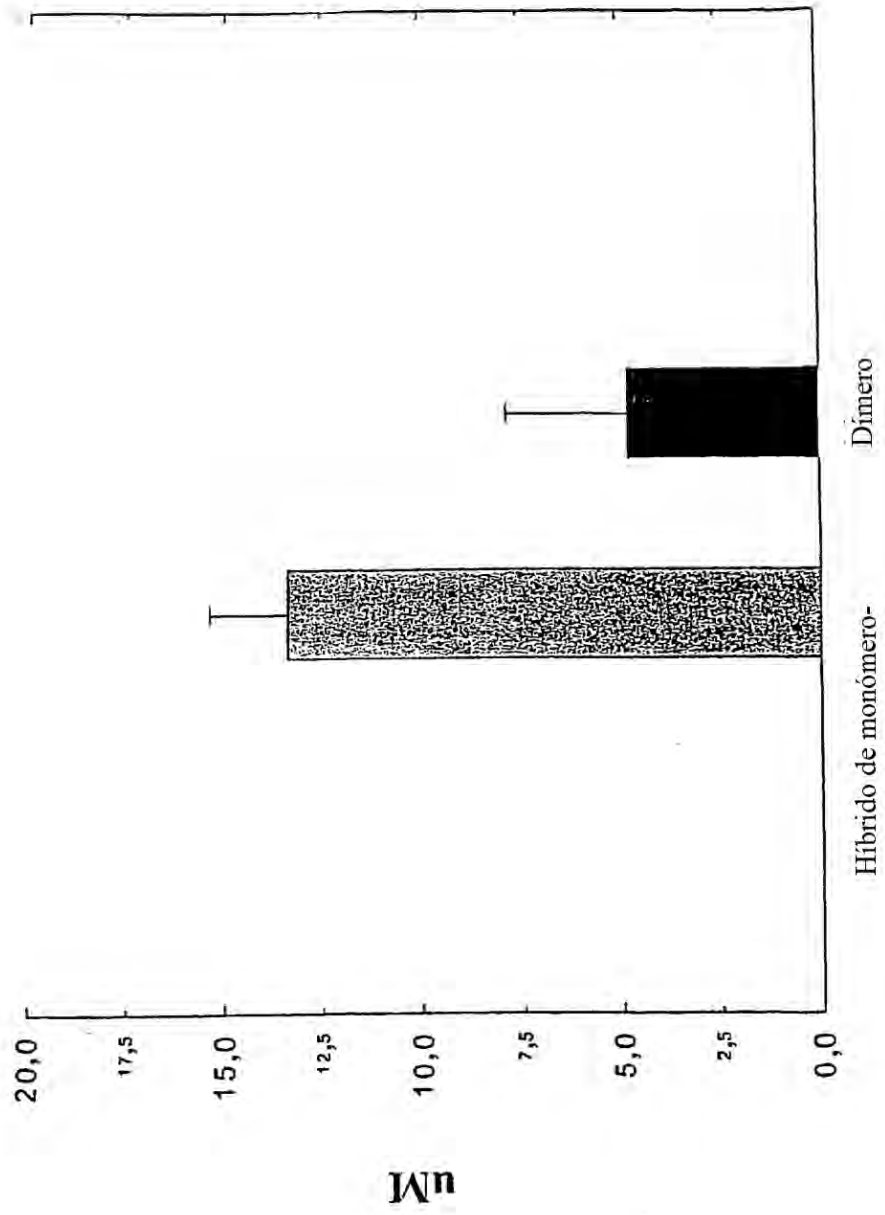


Fig. 9

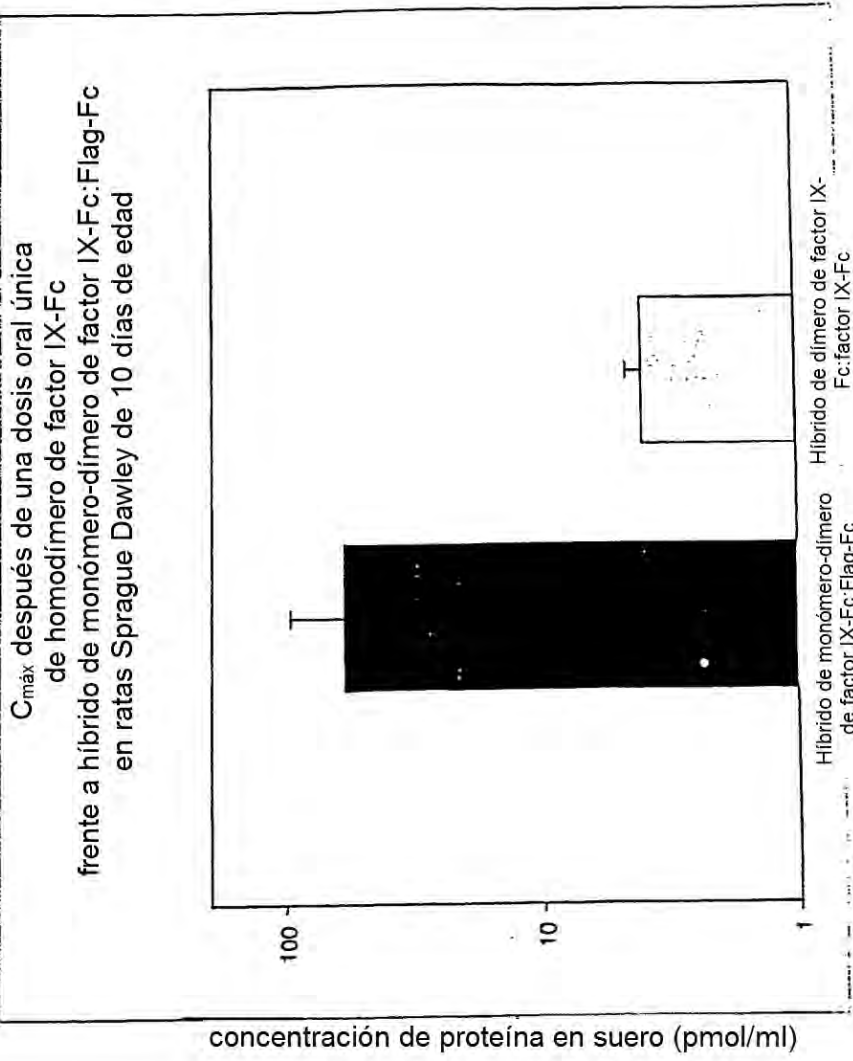


Fig. 10

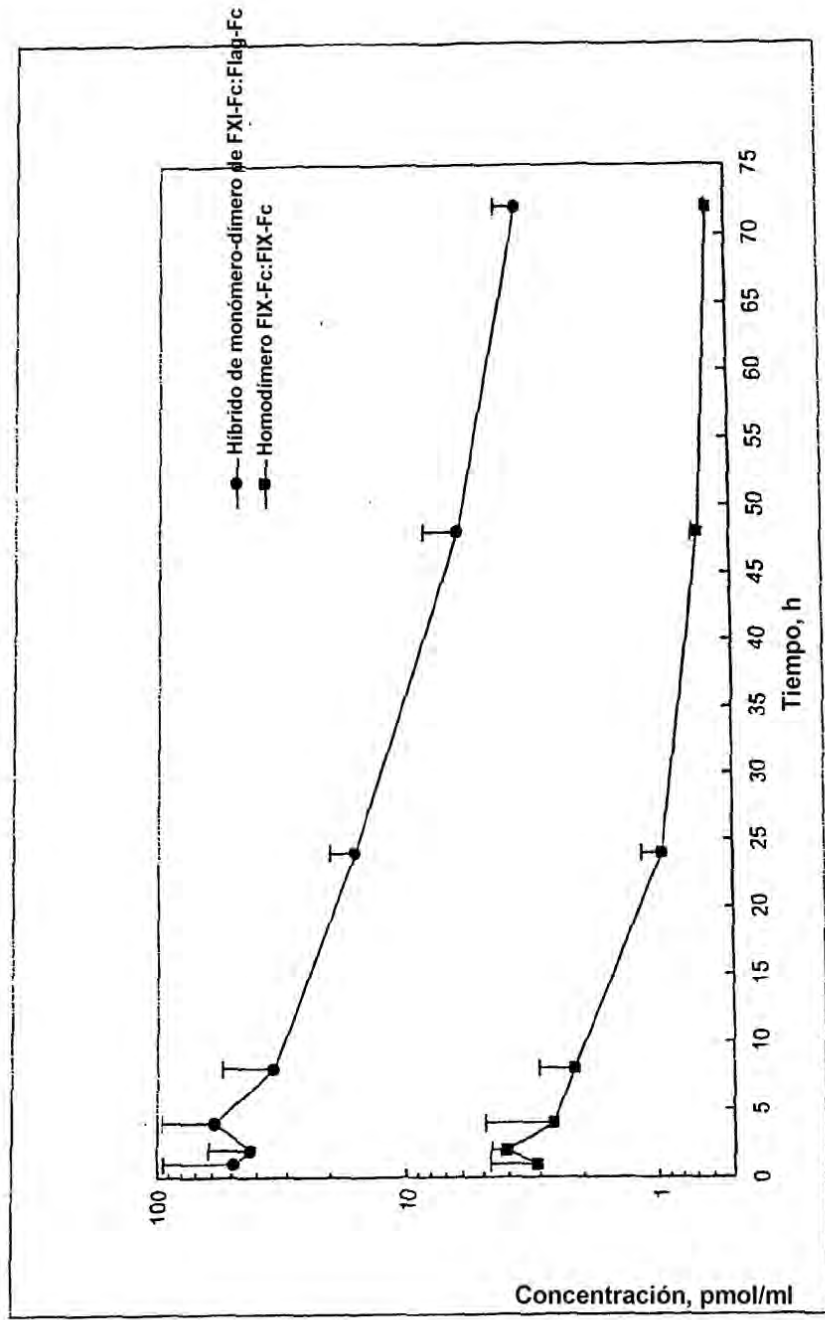


Fig. 11

Farmacocinética del dímero de Epo-Fc frente al híbrido de monómero-dímero en monos cinomolgos después de una comparación molar de una única dosis pulmonar

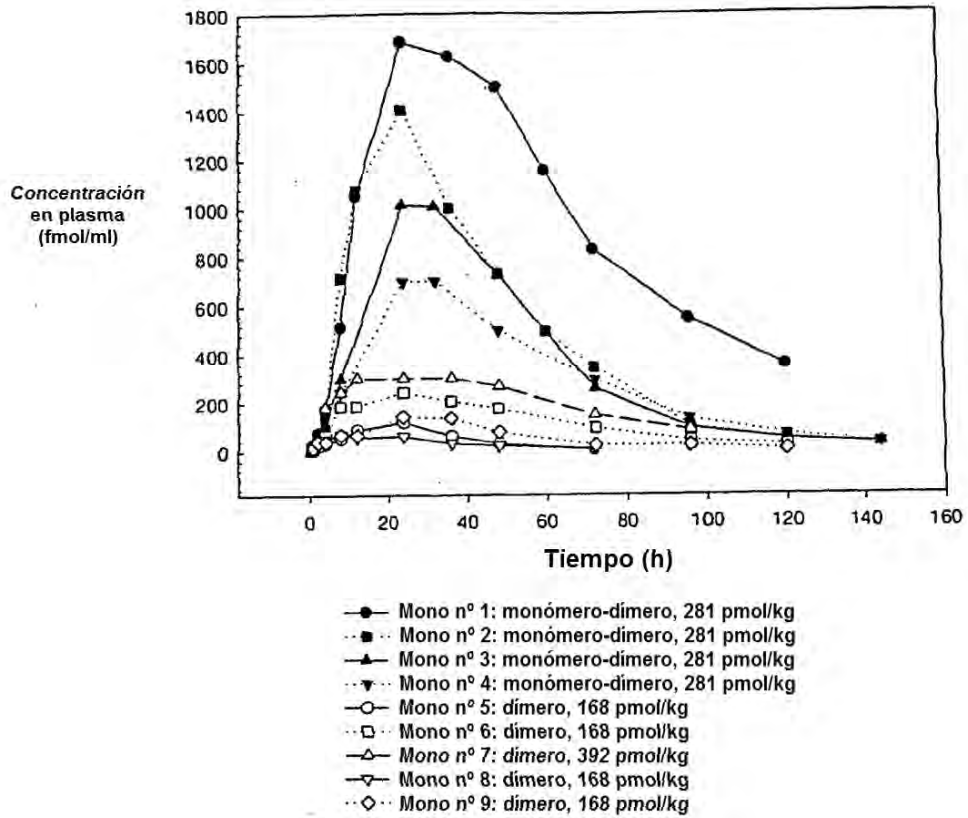


Fig. 12

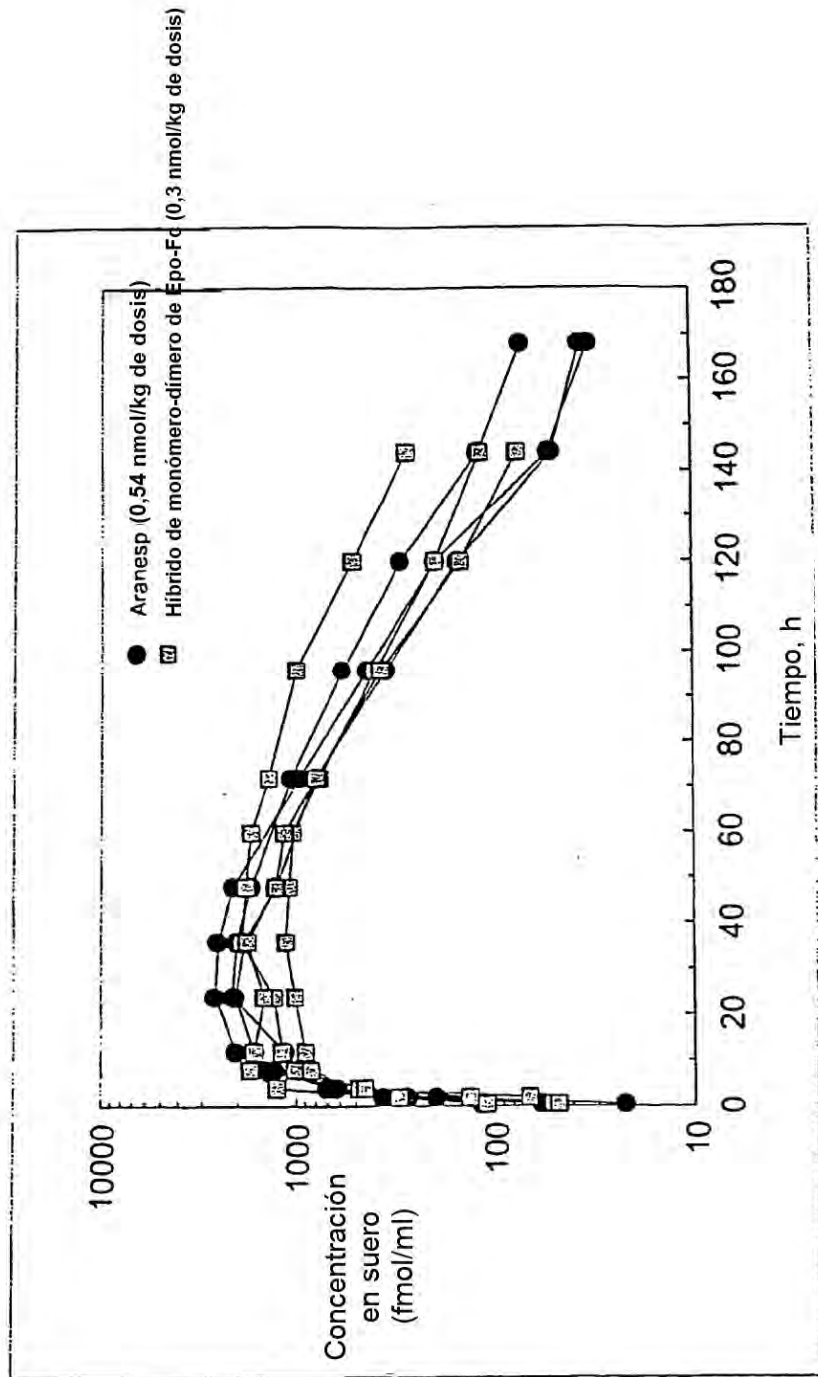
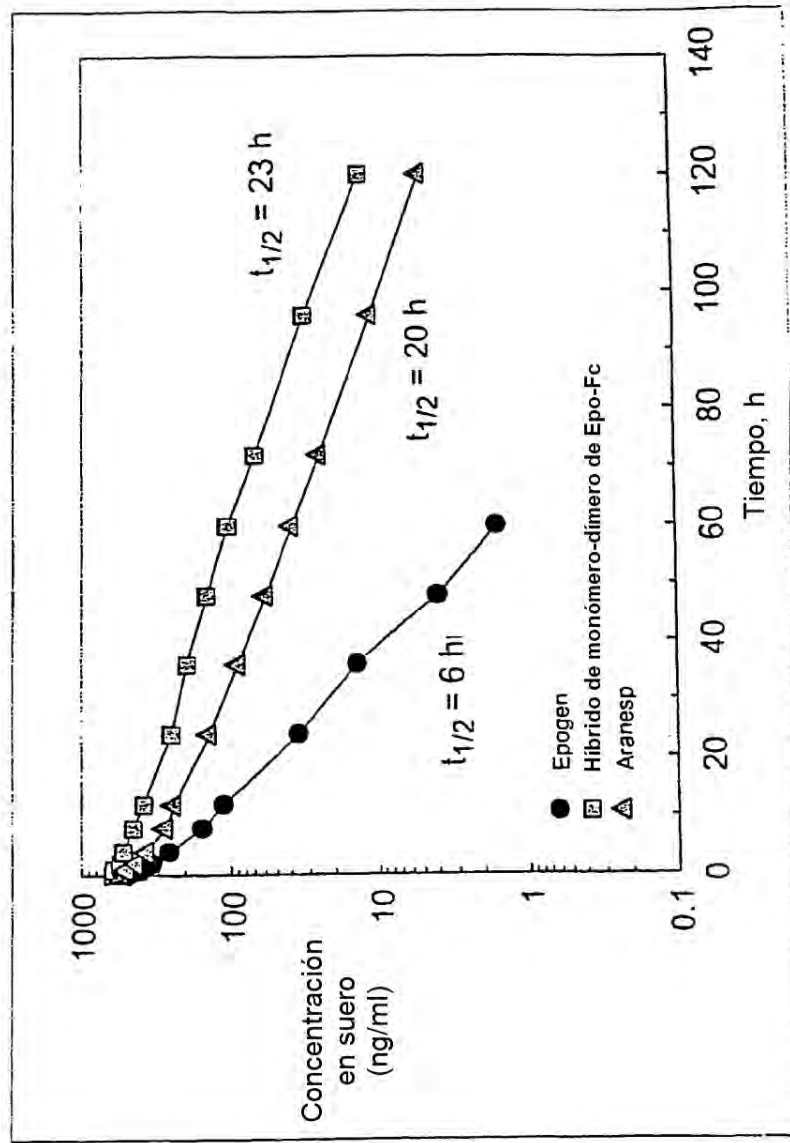


Fig. 13



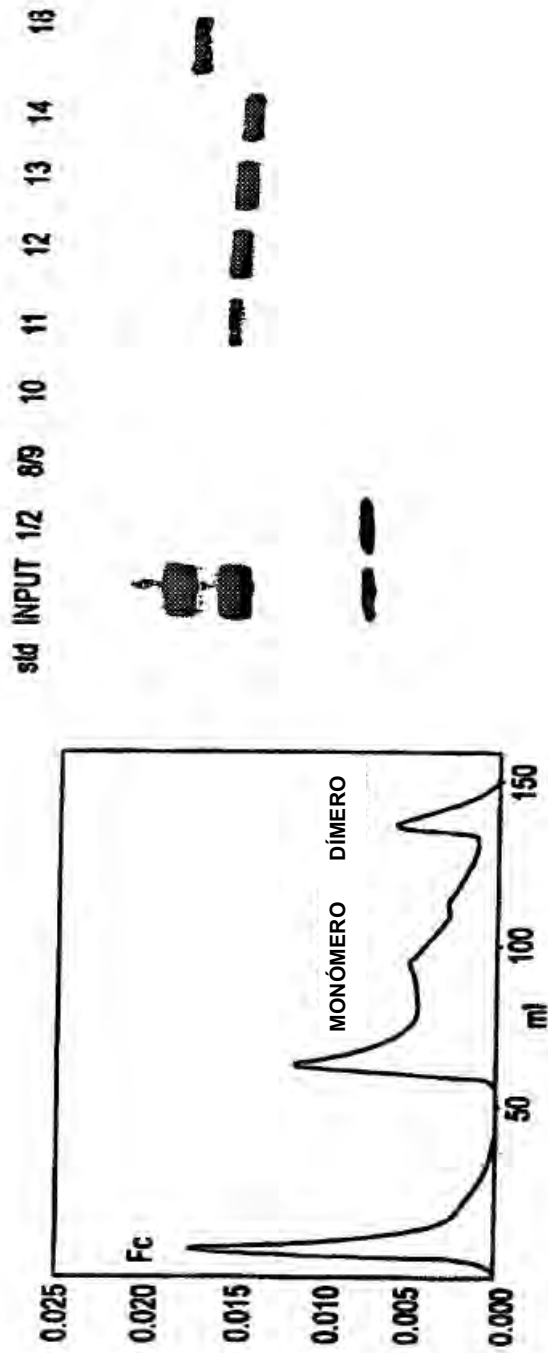


FIG. 14

Fig. 15

Farmacocinética de IFN β -008 (dímero natural de IFN β -Fc) e IFN β -009/Fc-014 (monómero de IFN β -Fc N297A) en suero de mono cinomolgo después de una única dosis pulmonar de 20 μ g/kg

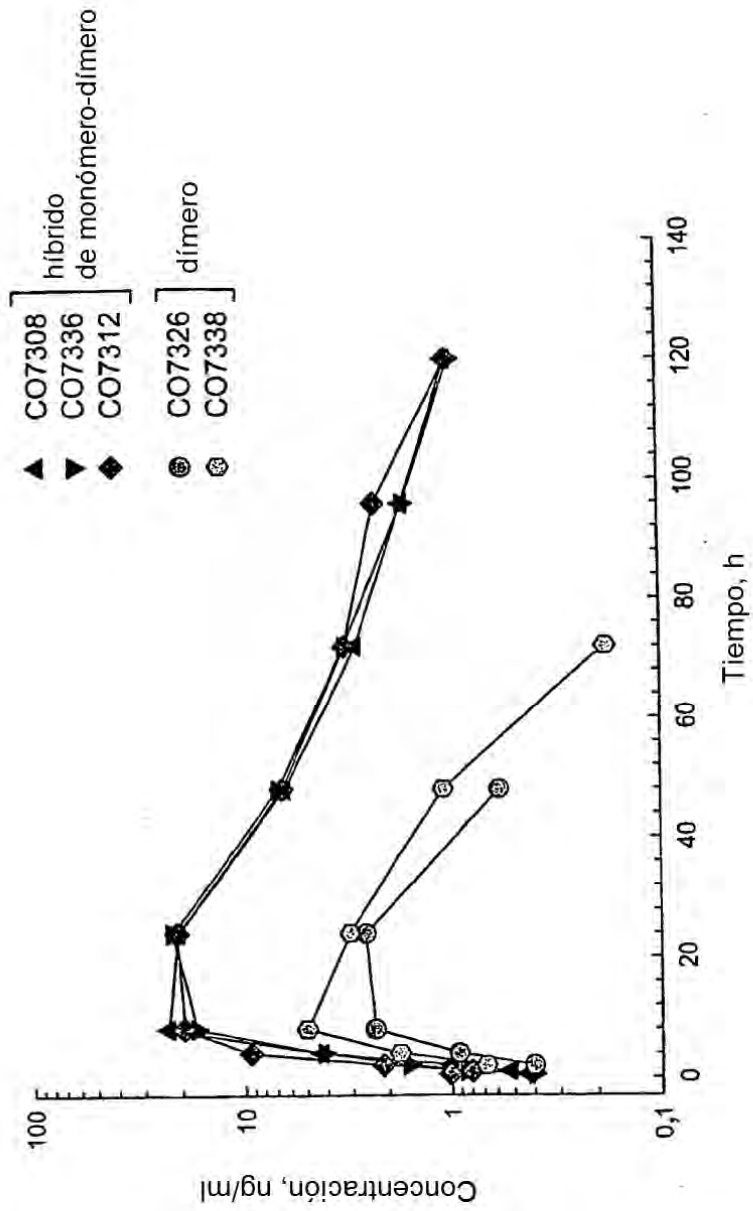


Fig. 16

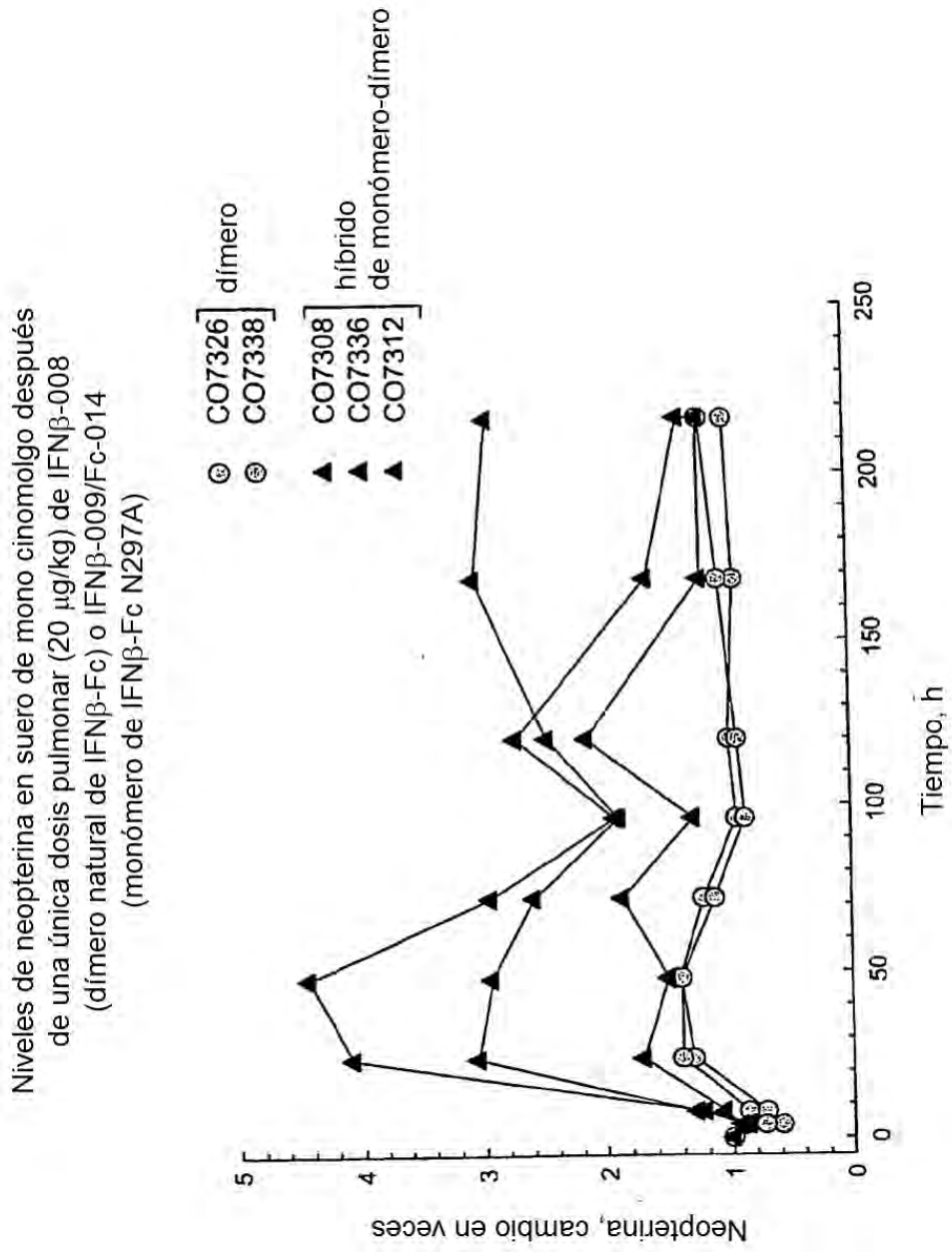


Fig. 17a

Secuencia de nucleótidos de IFN β -Fc (péptido señal subrayado)

```

atgaccaacaagtgtctcctccaaattgctctcctgttggtgcttctccaactacagctctttcca
tgagctacaacttgcttggattcctacaaagaagcagcaattttcagtggtcagaagctcctgtg
gcaattgaatgggaggcttgaatattgcctcaaggacaggatgaactttgacatccctgaggag
attaagcagctgcagcagttccagaaggaggacgcccattgaccatctatgagatgctccaga
acatctttgctattttcagacaagattcatctagcactggctggaatgagactattgttgagaa
cctcctggctaattgtctatcatcagataaaacctctgaagacagtcctggaagaaaaactggag
aaagaagatttcaccaggggaaaactcatgagcagctctgcacctgaaaagatatatggggagga
ttctgcattacctgaaggccaaggagtacagtcactgtgctggaccatagt cagagtggaat
cctaaggaacttttacttcattaacagacttacaggttacctccgaaacgagttcgcggcgcc
gctgcggtgcacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagctccggaactcctgggcggaccgt
cagctctcctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcac
atgctggtggtgggagcgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc
gtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtgg
tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctc
caacaaagccctcccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaa
ccacaggtgtacacctgccccatccccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct
gectggtcaaaggcttctatcccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgga
gaacaactacaagaccagcctcccgtgtggactccgacggctccttctcctctacagcaag
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg
ctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga
    
```

Fig. 17b

Secuencia de aminoácidos de IFN β -Fc (péptido señal subrayado, secuencia del ligando en negrita, N297 en negrita subrayado)

1	<u>MTNKLLQIA</u>	LLLCFSTTAL	SMSYNLLGFL	QRSSNFQCQK	LLWQLNGRLE
51	<u>YCLKDRMNF</u>	IPEEIKQLQQ	FQKEDAALTI	YEMLQNI FAI	FRQDSSSTGW
101	NETIVENLLA	NVYHQINHLK	TVLEEKLEKE	DFTRGKLMSS	LHLKRYYGRI
151	LHYLKAKEYS	HCAWTIVRVE	ILRNFYFINR	LTGYLRNEFA	GAAAVDKTHT
201	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
251	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	<u>YN</u> STYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN
301	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS
351	DIAVEWESNG	QPENNYKTP	PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC
401	SVMHEALHNS	YTQKSLSLSP	GK		

Fig. 18A

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEC ID N°: 99)

Fig. 18B

NNLRAIEAQQHLLQLTWGKQLQARILAVERYLKDQ (SEC ID N°: 100)

Fig. 18C

WQEWKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (SEC ID N°: 101)